

PRODUÇÃO DE ERITROPOIETINA EM CULTURAS DE CÉLULAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

Sónia Marisa Castanheira Dias

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção
do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Doutora Rita Abranches
Co-orientadora: Doutora Ana Sofia Pires

LISBOA

2009

Trabalho realizado no laboratório Plant Cell Biology, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, sob a orientação da Doutora Rita Abranches e co-orientação da Doutora Ana Sofia Pires

"...each living cell of a multicellular organism should be capable of independent development if provided with the proper external conditions..."

(Theodor Schwann, 1839, "Mikroskopische Untersuchungen ...", Sander, Berlin)

Agradecimentos

Quero dedicar este espaço às pessoas que mais me ajudaram neste percurso, contribuindo para que esta dissertação fosse realizada.

Em primeiro lugar expresso o meu mais profundo agradecimento à doutora Rita Abranches, que me acolheu no laboratório Plant Cell Biology como estudante de mestrado. Agradeço não só pela forma como orientou o meu trabalho, como também pela confiança em mim depositada para a sua realização, por todo o apoio demonstrado e pelo forte incentivo dado à realização desta tese. De uma maneira muito especial quero também agradecer à Doutora Ana Sofia Pires, co-orientadora desta dissertação, agradeço a cordialidade com que me recebeu e agradeço os seus ensinamentos que me ajudaram de forma determinante na efectivação deste estudo. A ambas é dirigido o meu maior obrigado por sempre me terem acompanhado na estruturação desta tese possibilitando a sua concretização num curto período de tempo.

Agradeço a Nuno Geraldo pela companhia diária no laboratório e pela disponibilidade demonstrada para esclarecer as minhas dúvidas de toda a natureza.

À Stefanie deixo um obrigado pela simpatia e ajuda dispensada na realização da parte experimental de microscopia.

À Susana Neves agradeço toda a curiosidade e interesse revelados para com o meu trabalho, assim como as suas visitas agradáveis ao laboratório.

Gostaria ainda de agradecer à professora Susana Barreiros pela ajuda na resolução dos problemas burocráticos que surgiram ao longo da minha tese.

Finalmente agradeço à minha família e a todos os meus amigos, que me apoiaram e acompanharam ao longo da minha vida.

Resumo

O uso de plantas transgênicas para a produção de proteínas recombinantes oferece muitas vantagens comparativamente a sistemas mais convencionais. As culturas de células vegetais em suspensão são particularmente interessantes pois combinam as vantagens da produção em plantas com os benefícios dos sistemas de produção baseados em culturas celulares.

Neste trabalho, culturas de células em suspensão de *Arabidopsis thaliana* foram usadas pela primeira vez para estudar a expressão de proteínas recombinantes, usando a eritropoietina como proteína modelo. Foram geradas culturas de células em suspensão de *Arabidopsis* a partir de plantas transgênicas expressando EPO na forma secretada (EPO-AH) e na forma retida no retículo endoplasmático (EPO-ERH). A presença de EPO-AH foi confirmada no meio de cultura e de EPO-ERH no extracto celular. A EPO-ERH produzida em *Arabidopsis* apresentou apenas uma isoforma e uma massa molecular superior comparativamente à EPO na forma secretada produzida em *Medicago*, também em estudo, o que pode ser um indicio de que a EPO secretada está a ser direccionada a vias não esperadas, sofrendo alterações no perfil de glicosilação.

Foram utilizadas várias estratégias para purificar EPO das culturas de células de *Arabidopsis* e de *Medicago*, incluindo cromatografia de troca iónica e de afinidade. A purificação parcial da EPO foi atingida usando cromatografia de troca catiónica como passo de purificação inicial.

Também se observou a morfologia celular e a viabilidade das culturas foi analisada usando microscopia óptica e de fluorescência. As culturas de ambas as espécies foram comparadas, realizando vários procedimentos de coloração com corantes fluorescentes. As culturas de *Arabidopsis* mostraram células com dimensões menores do que as de *Medicago*, e agregados celulares mais compactos. Nas células de *Medicago* o compartimento vacuolar ocupou a maioria do volume celular e a quantidade de citoplasma foi reduzida.

As culturas de células em suspensão de *Arabidopsis thaliana* constituem um sistema promissor para a produção de proteínas recombinantes. Os resultados obtidos neste estudo serão muito úteis para pesquisas futuras que irão contribuir para o estabelecimento de novas plataformas baseadas em plantas para produção de moléculas economicamente importantes.

Palavras-chave: Biotecnologia vegetal, *Molecular Farming*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, culturas de células em suspensão, proteína recombinante, eritropoietina

Abstract

The use of transgenic plants for the production of recombinant proteins offers many advantages when compared to more conventional systems. Plant cell suspension cultures are particularly interesting since they combine the advantages of plants with the benefits of production systems based on cell cultures.

In this work, *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures were used for the first time to study the expression of recombinant proteins, using erythropoietin as a model protein. Cell cultures were generated from transgenic *Arabidopsis* plants which express rEPO, either secreted (EPO-AH) or retained in the endoplasmic reticulum (EPO-ERH). For both forms we confirmed that the recombinant protein was present either in the culture medium or in the cellular extracts. The EPO-ERH produced in *Arabidopsis* showed only one isoform and a higher molecular weight compared to the secreted version of EPO produced in *Medicago*, also under study, which may be an indication that the secreted EPO is being directed to unexpected routes and undergoing changes in glycosylation profile.

Several strategies were addressed to purify EPO from cell cultures of *Arabidopsis* and *Medicago*, including ion-exchange and affinity chromatography. Partial purification of EPO was achieved using cation-exchange chromatography as the initial step of purification. Cell morphology was also observed and the viability of the cultures was analysed using light and fluorescence microscopy. The cultures of both plant species were compared by carrying out various staining procedures with fluorescent dyes.

Arabidopsis cultures showed smaller cells than those of *Medicago* and more compact clusters. In *Medicago* cells the vacuolar compartment took up most of the cellular volume and the cytoplasmatic volume was reduced.

Arabidopsis thaliana suspension cell cultures are a promising system for the production of recombinant proteins. The results of this study will be useful for future research that will contribute to the establishment of new plant-based platforms for production of high valuable molecules.

Key-words: Plant biotechnology, Molecular Farming, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, suspension cell cultures, recombinant protein, erythropoietin

Índice

| | |
|---|-----|
| Agradecimentos | III |
| Resumo | IV |
| Abstract..... | V |
| Índice | VI |
| Lista de figuras | IX |
| Lista de tabelas | XI |
| Abreviaturas | XII |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1.1 Condições de crescimento e meio de cultura de células vegetais..... | 1 |
| 1.2.1 Estabelecimento de linhas celulares transgênicas | 3 |
| 1.3 Produção de proteínas recombinantes em células vegetais..... | 4 |
| 1.3.1 Recuperação e purificação da proteína recombinante | 5 |
| 1.3.2 Desafios específicos para obter melhores rendimentos..... | 6 |
| 1.4 <i>Molecular Farming</i> | 6 |
| 1.5 Plantas como plataforma de produção de proteínas recombinantes | 8 |
| 1.5.1 Espécies vegetais hospedeiras para <i>Molecular Farming</i> | 11 |
| 1.5.2 Modificações pós-traducionais..... | 11 |
| 1.5.3 Estratégias para humanizar N-glicanos de proteínas produzidas em plantas | 13 |
| 1.5.4 Distribuição subcelular de proteínas..... | 14 |
| 1.6 <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema de expressão..... | 15 |
| 1.7 Eritropoietina como proteína modelo..... | 16 |
| 1.7.1 Sistemas de expressão convencionais de EPO | 17 |
| 1.7.2 Sistemas de expressão vegetais de EPO | 17 |
| 1.8 Objectivos | 19 |
| 2. Materiais e métodos..... | 21 |
| 2.1 Material vegetal | 21 |
| 2.1.1 Vectors otimizados para transformação de plantas..... | 22 |
| 2.1.2 Geração de linhas transgênicas homozigóticas de <i>Arabidopsis</i> , na terceira geração, expressando EPO | 23 |
| 2.2 <i>Screening</i> das plantas transgênicas de terceira geração | 23 |
| 2.2.1 Obtenção do extracto proteico total..... | 23 |
| 2.2.2 <i>Dot-blot</i> para confirmação da presença de proteína..... | 24 |
| 2.2.3 Preparação de amostras para SDS-PAGE | 24 |

| | |
|---|----|
| 2.3 Preparação do gel de poliacrilamida para SDS-PAGE | 25 |
| 2.4 Coloração do gel de poliacrilamida com azul de Coomassie..... | 26 |
| 2.5 Transferência das proteínas do gel de poliacrilamida-SDS para suporte sólido | 26 |
| 2.6 Imunodeteção de proteínas | 27 |
| 2.7 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford..... | 28 |
| 2.8 Concentração da amostra..... | 28 |
| 2.8.1 Dispositivos de ultrafiltração Centricon..... | 29 |
| 2.8.2 Dispositivos de ultrafiltração Amicon | 29 |
| 2.8.3 Precipitação com etanol absoluto | 29 |
| 2.9 Estabelecimento de culturas de células vegetais em suspensão..... | 29 |
| 2.10 Taxa de crescimento de culturas de células vegetais..... | 30 |
| 2.10.1 Curvas de crescimento..... | 30 |
| 2.11 Purificação de EPO | 31 |
| 2.11.1 Purificação de afinidade a metais imobilizados | 31 |
| 2.11.2 Cromatografia de troca iônica | 32 |
| 2.12 Separação de proteínas com sulfato de amônio | 32 |
| 2.13 Análise das células por microscopia | 33 |
| 3. Resultados e discussão..... | 34 |
| 3.1 Estabelecimento de culturas de células de <i>Arabidopsis</i> em suspensão..... | 34 |
| 3.1.1 Seleção das plantas de <i>Arabidopsis</i> com maior nível de expressão de EPO..... | 34 |
| 3.1.2 Estabelecimento das culturas de células em suspensão | 36 |
| 3.1.3 Avaliação do nível de expressão de proteína | 36 |
| 3.1.4 Comparação dos níveis de expressão de EPO das diferentes linhas celulares de <i>Arabidopsis</i> | 37 |
| 3.2 Purificação parcial de EPO | 40 |
| 3.2.1 Purificação parcial de EPO do meio de cultura celular da espécie <i>Medicago truncatula</i> | 40 |
| 3.2.2 Purificação parcial de EPO do meio de cultura celular de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 46 |
| 3.3 Análise da cinética de crescimento da cultura de <i>Arabidopsis</i> | 48 |
| 3.4 Análise da morfologia e da viabilidade das células | 49 |
| 3.4.2 Análise da viabilidade das células de <i>Medicago</i> e de <i>Arabidopsis</i> | 51 |
| 4. Conclusões e perspectivas futuras | 55 |
| 5. Referências bibliográficas..... | 60 |
| Anexos..... | 67 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Adição e processamento de N-glicanos no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi em plantas e mamíferos..... | 13 |
| Figura 2: Mapas dos vectores de expressão pTRA-EPO-AH e pTRA-EPO-ERH..... | 22 |
| Figura 3: T-DNA de EPO-ERH (com KDEL)..... | 23 |
| Figura 4: Tanque Mini-Protean® 3Cell Bio-Rad com amostras a migrar..... | 26 |
| Figura 5: Esquema representativo de montagem de uma transferência semi-seca | 27 |
| Figura 6: Esquema representativo da imunodeteção colorimétrica , usando um Ab conjugado, Biorad..... | 28 |
| Figura 7: <i>Dot-blot</i> de extracto de folhas de <i>Arabidopsis</i> transgénica expressando EPO na forma secretada | 34 |
| Figura 8: SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> de extracto de folhas de <i>Arabidopsis</i> transgénica expressando EPO na forma secretada..... | 35 |
| Figura 9: SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> de extracto de folhas de <i>Arabidopsis</i> transgénica expressando EPO na forma retida | 35 |
| Figura 10: Esquema do estabelecimento de uma cultura de células em suspensão a partir de <i>calli</i> | 36 |
| Figura 11: SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> de meio de cultura da linha 1A de <i>Arabidopsis</i> com 17 dias. | 37 |
| Figura 12: SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> dos meios de cultura das linhas celulares 1A, 8A e 12B de <i>Arabidopsis</i> | 38 |
| Figura 13: SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> de extracto celular da linha celular de <i>Medicago truncatula</i> expressando EPO na forma secretada como controlo positivo e de extracto celular da linha 11.3A de <i>Arabidopsis</i> expressando EPO na forma retida..... | 39 |
| Figura 14: SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> de fracções obtidas por cromatografia de troca catiónica de meio de cultura da linha celular de <i>Medicago</i> expressando EPO na forma secretada. | 42 |
| Figura 15: SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> de fracções obtidas por cromatografia de troca catiónica..... | 43 |
| Figura 16: SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> de fracções obtidas por cromatografia de afinidade de amostra resultante de duas fracções obtidas após passo de cromatografia de troca catiónica... | 45 |

| | |
|--|----|
| Figura 17: SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> com Ab anti-histidina e com Ab anti-EPO de extracto celular e de meio de cultura da linha celular de <i>Medicago truncatula</i> expressando EPO na forma secretada..... | 46 |
| Figura 18: SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> de fracções obtidas por cromatografia de troca catiónica do meio de cultura da linha celular 1A de <i>Arabidopsis</i> | 47 |
| Figura 19: Cinética de crescimento de cultura de células em suspensão de <i>Arabidopsis</i> transgénica | 48 |
| Figura 20: Morfologia de células em suspensão de <i>Medicago truncatula</i> expressando fitase na forma secretada e expressando EPO na forma secretada..... | 50 |
| Figura 21: Morfologia de células em suspensão de <i>Arabidopsis</i> expressando EPO na forma secretada e expressando EPO na forma retida. | 51 |
| Figura 22: Análise da viabilidade de células em suspensão de <i>Medicago</i> expressando fitase na forma secretada. | 52 |
| Figura 23: Análise da viabilidade de células em suspensão de <i>Medicago</i> expressando EPO na forma secretada. | 52 |
| Figura 24: Análise da viabilidade de células em suspensão de <i>Medicago</i> expressando fitase na forma secretada. | 53 |
| Figura 25: Análise da viabilidade de células em suspensão de <i>Arabidopsis</i> expressando EPO na forma secretada. | 54 |
| Figura 26: Curva de calibração padrão da concentração de proteína BSA..... | 67 |
| Figura 27: Germinação de sementes de terceira geração..... | 71 |

Lista de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Alguns exemplos de produtos farmacêuticos produzidos em plantas | 8 |
| Tabela 2: Preparação do gel de concentração e do gel de resolução | 25 |
| Tabela 3: Coloração com prata de géis de acrilamida | 67 |
| Tabela 4: Crescimento da biomassa (peso fresco e peso seco (g) por ml de meio de cultura) .. | 71 |

Abreviaturas

Ab - Anticorpo

FDA - *Food and Drug Administration*

EPO - Eritropoietina

rhEPO - Eritropoietina humana recombinante

EPO-AH - Eritropoietina recombinante com péptido sinal

EPO-ERH - Eritropoietina recombinante com péptido sinal e sequência KDEL

TSP - Proteína solúvel total

T-DNA - Ácido Desoxirribonucleico de Transferência

2,4-D - Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

R.E. - Retículo endoplasmático

NBT/BCIP - Substrato cromogénico *Nitro-Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl*

Phosphate

BSA - Albumina de soro bovino

CHO - Linha de células de mamífero *Chinese Hamster Ovary*

COS-1 - Linha de células de mamífero de rim de macaco *Cercopithecus aethiops*, origin-defective SV-40

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

BY-2 - Linha celular de tabaco *Bright Yellow-2*

KDEL - Lisina-Ácido aspártico-Ácido glutâmico-Leucina

PBS - *Phosphate Buffer Saline*

PBST - PBS com detergente Tween 20

ELP - *Elastin-Like Polypeptides*

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

CaMV - *Cauliflower mosaic virus*

MARs - *Matrix Attachment Regions*

TEMED - *Tetramethylethylenediamine*

Neu5Ac - Ácido N-acetil-neuramínico

1. Introdução

1.1 Cultura *in vitro* de tecidos vegetais

Os primeiros trabalhos com a cultura de tecidos, foram publicados em 1902 por Haberlandt que foi um grande impulsionador da cultura de tecidos *in vitro*. As suas tentativas de regeneração de plantas originadas de uma única célula não foram bem sucedidas, possivelmente, em virtude da falta de hormonas vegetais no meio nutritivo, que até então eram compostos desconhecidos, bem como em decorrência da utilização de espécies inadequadas, da baixa densidade de inóculo e explantes de tecidos maduros. No entanto o seu trabalho contribuiu de forma decisiva para o desenvolvimento de pesquisas futuras nesta área. Haberlandt ainda estabeleceu o conceito de totipotência celular que era inerente à teoria celular de Schleiden e de Schwann que reconhece a célula como a unidade primária de todos os organismos vivos e que constitui a base da biotecnologia vegetal (Thorpe, 2007; Vasil, 2008).

Os primeiros trabalhos conduziram a culturas de raízes, culturas de embriões, e às primeiras verdadeiras culturas de *callus*/tecidos. As primeiras culturas de tecidos vegetais foram obtidas em 1934 por Gautheret de tecido cambial de *Acer pseudoplatanus*. Os anos seguintes, de 1940 a 1960, foram marcados pelo desenvolvimento de novas técnicas e aperfeiçoamento das já disponíveis. Foi durante este período de tempo que a maioria das técnicas *in vitro* usadas hoje foram grandemente desenvolvidas (Thorpe, 2007; Vasil, 2008).

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta importante em estudos de Ciência fundamental e em estudos aplicados para a Indústria. Pode ser definida como uma cultura asséptica de protoplastos, células, tecidos ou órgãos e os seus componentes mantidos sob condições ambientais controladas *in vitro*. A cultura *in vitro* baseia-se na totipotência e plasticidade da célula vegetal. A maioria das células mantém a totipotência podendo dar origem a massas de células indiferenciadas que podem ser mantidas indefinidamente em cultura. Devido às suas propriedades é possível direccionar o desenvolvimento de células vegetais em cultura por manipulação dos componentes do meio (Thorpe, 2007).

1.1.1 Condições de crescimento e meio de cultura de células vegetais

As células vegetais em cultura *in vitro* não conseguem sintetizar os seus próprios nutrientes. É a composição do meio de cultura que permite às células vegetais crescerem e desenvolverem-se.

O meio deve fornecer alguns componentes básicos como minerais essenciais que são fornecidos como uma mistura complexa de sais, suplementos orgânicos como vitaminas e aminoácidos, uma fonte de carbono que é geralmente fornecida através do açúcar sacarose e reguladores de crescimento. Em relação ao ambiente de cultura, também devem ser mantidos alguns parâmetros dentro de limites aceitáveis, tais como, a temperatura, o pH, luz e o arejamento (ver e.g. Slater *et al.*, 2003).

Os reguladores de crescimento das plantas mais usados são as hormonas vegetais ou os seus análogos sintéticos que englobam cinco classes principais: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (ver e.g. Slater *et al.*, 2003).

As auxinas e as citocininas promovem a divisão celular e são as duas hormonas vegetais mais usadas. A proporção entre auxina e citocinina usada determina o tipo de cultura estabelecido ou regenerado. Uma concentração maior de auxina em relação a citocinina favorece a formação de raízes, ao passo que uma maior concentração de citocinina favorece a formação de rebentos. Uma concentração semelhante das duas hormonas favorece a produção de *callus*.

As auxinas foram as primeiras hormonas a serem descobertas, promovem a divisão e o crescimento das células. O ácido indol-acético (IAA) ocorre naturalmente em tecidos vegetais, mas o seu uso em cultura de tecidos é limitado devido à sua instabilidade sob calor e luz, razão pela qual geralmente é usado o ácido 2,4-diclorofenoxiacético, análogo sintético de IAA, como fonte de auxina, mostrando-se extremamente eficiente.

As citocininas promovem a divisão celular, modificação da dominância apical e diferenciação de rebentos em cultura de tecidos. A zeatina e a isopenteniladenina (2-IP) são duas citocininas que ocorrem naturalmente. A zeatina é usada em cultura de tecidos, mas é cara e relativamente instável, por isso, usam-se análogos sintéticos que incluem benzilaminopurina (BAP) e 6-furfurilaminopurina (cinetina). Geralmente, depois de um certo período em cultivo, as células adquirem a capacidade para crescerem e se dividirem independentemente de reguladores de crescimento. Este fenómeno que ocorre naturalmente é conhecido por habituação (Slater *et al.*, 2003).

1.2 Culturas de células vegetais em suspensão

As técnicas de cultura de células vegetais em suspensão iniciaram-se na década de 1960 como uma ferramenta possível para estudar e produzir metabolitos secundários de plantas (revisto por Mulabagal e Tsay, 2004). Estes compostos são conhecidos por desempenharem um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes e também representam uma fonte

importante de substâncias farmacologicamente activas. Tradicionalmente eram extraídos das plantas e usados como aditivos alimentares, pigmentos, corantes, insecticidas, cosméticos e perfumes e em química fina. Todavia devido a instabilidades ambientais e geopolíticas, os habitats naturais de plantas medicinais encontram-se em perigo e consequentemente as plantas correm risco de extinção, tornando-se difícil adquirir compostos derivados destas plantas (Mulabagal e Tsay, 2004). Avanços em biotecnologia possibilitaram o uso de culturas de células vegetais como uma alternativa potencial à agricultura convencional para a produção de metabolitos secundários.

Existem várias estratégias, usando sistemas de cultura *in vitro*, que têm sido estudadas com o objectivo de aumentar e melhorar a produção de metabolitos secundários. Contudo, apenas um número reduzido de compostos tem sido produzido e comercializado a partir da cultura de células em suspensão, devido em parte à dificuldade em atingir rendimentos moderados. Exemplos de produção em larga escala destas substâncias são os alcalóides, paclitaxel e shikonin (Boehm, 2007). Este último foi, nos anos oitenta, o primeiro exemplo de uma aplicação industrial de um metabolito de planta produzido em culturas de células vegetais (Sommer *et al.*, 1999).

1.2.1 Estabelecimento de linhas celulares transgénicas

As suspensões de células vegetais transformadas podem ser obtidas directamente de uma planta transformada ou por transformação de uma cultura *wild type*. No primeiro caso, todas as células estão transformadas e não há necessidade de selecção. No segundo caso, as células podem ser transformadas por co-cultivo com *Agrobacterium* (An, 1985) ou por bombardeamento de partículas (Christou *et al.*, 1988), em que deve existir um passo extra de selecção.

O *callus* é um tecido indiferenciado obtido de explantes cultivados em meio sólido contendo a mistura apropriada de hormonas vegetais para manter o estado indiferenciado. As culturas de tecidos vegetais podem ser iniciadas de qualquer parte da planta (raízes, caule, folhas ou sementes). Geralmente os explantes mais adequados são os de tecidos mais jovens, saudáveis e que se encontram em divisão celular. O explante deve ser esterilizado para remover contaminação microbiana, antes de ser iniciada a cultura. A cultura de *callus* é sempre induzida e mantida no escuro de forma a evitar diferenciação induzida por luz.

Quando o *callus* é colocado em meio líquido com todos os elementos e nutrientes requeridos para o crescimento óptimo (geralmente com a mesma composição que o meio sólido usado para o *callus* com excepção do agente solidificante) e agitado, células isoladas ou aglomerados de células são libertadas para o meio. Sob condições adequadas, as células crescem e dividem-se

produzindo uma cultura celular em suspensão. Para iniciar uma cultura deve ser usado um inóculo relativamente grande para que as células acumulem rapidamente. No entanto o inóculo também não deve ser demasiado grande, pois produtos tóxicos libertados de células danificadas ou sob pressão poderiam acumular a níveis letais. Aglomerados celulares grandes podem ser removidos durante a subcultura da suspensão celular.

As suspensões celulares podem ser mantidas como culturas *batch* em frascos *Erlenmeyer* ou em fermentadores. O meio de cultura é continuamente substituído por meio fresco, resultando em diluição da suspensão e início de outro ciclo de crescimento *batch*. O grau de diluição durante a subcultura deve ser determinado empiricamente para cada cultura. Um grau de diluição demasiado grande resultaria num período *lag* prolongado e em casos extremos morte das células transferidas.

Após subcultura, as células dividem-se e a biomassa da cultura aumenta até os nutrientes do meio esgotarem e/ou acumularem subprodutos tóxicos a níveis inibitórios, fase designada por fase estacionária. Se as células permanecem por demasiado tempo nesta fase, ocorre morte celular e a cultura será perdida. Devido a este facto, as células devem ser transferidas em intervalos regulares que coincidem com os ciclos de vida culminando na fase estacionária, razão por que é importante determinar os parâmetros de ciclo de crescimento em *batch* para cada cultura celular em suspensão (Slater *et al.*, 2003).

1.3 Produção de proteínas recombinantes em células vegetais

Do uso de plantas transgénicas como plataforma de produção podem surgir alguns problemas, tais como, variação de produção da proteína ao longo de várias gerações, inactivação do gene e ainda contaminação do campo de cultivo.

As proteínas com fins terapêuticos devem ser produzidas em condições controladas e de elevada esterilidade a fim de possibilitar a aprovação pelas entidades regulamentares necessária para comercializar qualquer produto farmacêutico independentemente da fonte de produção. A cultura de células vegetais *in vitro* apresenta-se vantajosa quando este tipo de produto é desejado, possibilitando a sua obtenção em condições controladas e reprodutíveis, independentemente da sazonalidade dos ciclos agrícolas.

Numa determinada cultura as células vegetais são geralmente uniformes em tamanho e tipo, conduzindo a elevada homogeneidade das proteínas produzidas nestas células comparativamente à planta (Liénard *et al.*, 2007). Além disso, o procedimento torna-se mais simples para o isolamento e purificação do produto relativamente ao uso de plantas, especialmente quando o produto é secretado para o meio de cultura. As culturas celulares

evitam problemas que surgem de plantas transgênicas que crescem em campo, enquanto retêm as vantagens dos sistemas de produção vegetal (Stoger *et al.*, 2002; revisto por Hellwig *et al.*, 2004), e beneficiam do conhecimento de tecnologia de cultura de células. Este tipo de sistema revela-se vantajoso ao proporcionar consistência do produto entre lotes, elevado nível de contenção, tempo de geração mais rápido, baixo custo de manutenção, controlo preciso sobre as condições de crescimento e a possibilidade de controlar todos os passos do processo sob práticas de fabrico certificadas (revisto por Hellwig *et al.*, 2004). O meio de cultura é mais simples que o de células de mamífero, composto principalmente por açúcares simples (sacarose) e por sais inorgânicos (Boehm, 2007).

1.3.1 Recuperação e purificação da proteína recombinante

As proteínas recombinantes expressas em culturas de células vegetais podem ser secretadas para o meio da cultura ou retidas dentro das células. Isto depende da natureza de péptidos sinal na construção e da permeabilidade da parede da célula vegetal a macromoléculas. Péptidos sinal podem ser usados para direccionar a proteína para a via secretora (apoplasto) ou para organelos específicos tais como o retículo endoplasmático ou cloroplasto (revisto por Schillberg *et al.*, 2003).

A purificação normalmente representa a maior parte do custo de produção biofarmacêutica em plantas (Daniell *et al.*, 2001). As proteínas secretadas são vantajosas porque evitam a lise das células para extracção da proteína no processo de purificação, além disso, o sobrenadante da cultura contém menor quantidade de proteínas contaminantes e outros metabolitos que os extractos celulares. A lise celular liberta substâncias fenólicas ou proteases que baixam o rendimento da proteína (revisto por Schillberg *et al.*, 2003; revisto por Hellwig *et al.*, 2004). Se a proteína recombinante é secretada, elimina a necessidade de destruir as células e pode ser recuperada após um passo de remoção das células por filtração antes do início da purificação (revisto por Schillberg *et al.*, 2003).

As culturas de células vegetais em suspensão são valiosas para a produção de proteínas recombinantes biologicamente activas, mas a recuperação de proteínas secretadas tem sido limitada devido a produtividade baixa e a instabilidade da proteína. No entanto, num estudo realizado recentemente por Pires *et al.* (2008) foram atingidos níveis elevados da proteína recombinante fitase em culturas de células em suspensão de *Medicago truncatula*, demonstrando assim que nem sempre são baixos os rendimentos obtidos em culturas de células em suspensão.

1.3.2 Desafios específicos para obter melhores rendimentos

Existem ainda algumas limitações no uso de culturas de células vegetais em suspensão como sistemas de produção e que consistem na instabilidade das linhas celulares, baixos rendimentos, crescimento lento e problemas no *scale-up*. Também pode ocorrer variação somaclonal, silenciamento de genes, inibição de formação de produto devido a elevadas densidades celulares e/ou elevados níveis de acumulação do produto (revisto por Hellwig *et al.*, 2004). Os baixos níveis da proteína desejada atingidos nestas culturas podem ser melhorados por optimização das condições de crescimento para cada linha celular, optimização dos nutrientes do meio de cultura, direccionando a proteína recombinante para a via secretora pela adição de um péptido líder ou pelo uso de promotores mais fortes que sobre-expressem o transgene nas células. É ainda fundamental a escolha de uma planta-mãe que seja uma espécie de elevada produção, selecção de linhas de *callus* com elevados conteúdos do produto desejado, características de crescimento favoráveis e estabilidade genética.

A maior parte das culturas de células vegetais em suspensão são constituídas por agregados, contrariamente às culturas microbianas que são constituídas por células individualizadas. A dimensão dos agregados varia ao longo do perfil de crescimento e das condições estabelecidas, como por exemplo as condições de agitação em bioreactores. As células têm ainda a tendência para aderir às paredes do bioreactor e por vezes apresentam sensibilidade ao cisalhamento hidrodinâmico. Para resolver estes problemas devem ser criados novos fermentadores com a configuração ideal para o cultivo de células vegetais (revisto por Hellwig *et al.*, 2004).

As condições óptimas para crescimento celular e rendimento de produto variam de espécie para espécie, sendo fulcral determinar as condições óptimas para cada sistema.

1.4 Molecular Farming

Durante milhares de anos as plantas têm servido de alimento aos seres humanos e são fonte de produtos naturais, tais como produtos farmacêuticos, corantes, venenos e materiais como o algodão e a borracha (revisto por Schillberg *et al.*, 2003).

A partir da década de 1980 um conjunto de estratégias e técnicas em Biotecnologia foram desenvolvidas para introduzir DNA exógeno em plantas, permitindo às plantas serem usadas para a produção de proteínas heterólogas. A produção de proteínas recombinantes em larga escala em sistemas vegetais é conhecida por *Molecular Farming* e tem actividade desde que a primeira planta foi transformada com sucesso pela equipa de R. Fraley (McCormick *et al.*, 1986).

O desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante tem possibilitado a produção de proteínas em grandes quantidades em sistemas vegetais. Os principais campos de aplicação

são terapêuticos para uso em saúde animal e humana, diagnósticos e enzimas utilizadas em técnicas bioquímicas (Boehm, 2007). A primeira proteína recombinante produzida em plantas foi uma hormona de crescimento humano expressa em *callus* de tabaco por Barta *et al.* (1986). Pouco tempo depois foi expresso o primeiro anticorpo em tabaco por Hiatt *et al.* (1989) demonstrando que as plantas possuem a capacidade de produzir proteínas animais complexas funcionais, representando o maior avanço na produção de biomoléculas medicinais em plantas (Fischer e Emans, 2000).

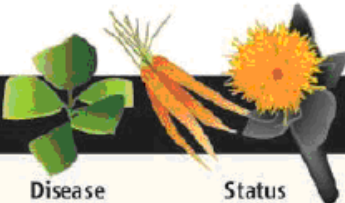
Nos últimos anos *Molecular Farming* tem sofrido um desenvolvimento considerável em todo o mundo, sendo várias as empresas e universidades que se dedicam a investigação nesta área, inclusive com pedidos de patentes solicitados (Basaran e Rodríguez-Cerezo, 2008a).

Várias proteínas recombinantes derivadas de plantas para uso terapêutico estão já em ensaios clínicos avançados. Alguns exemplos são o interferão alfa desenvolvido pela companhia *Biolex Therapeutics*, usado no tratamento de hepatite C (fase II), a insulina aplicada a doentes com diabetes (fase I/II) e a lipase que é usada para tratamento de fibrose cística (fase III). O anticorpo anti-hepatite B foi aprovado pelas entidades regulamentares, em Cuba, para produção em larga escala e já se encontra no mercado. Alguns produtos farmacêuticos produzidos em plantas obtiveram aprovação recentemente, tais como o anticorpo CaroRx, produzido em tabaco, contra a colonização oral da superfície dos dentes por *Streptococcus mutans*, principal agente causador da cárie e o factor intrínseco humano usado para tratar doentes que sofrem de insuficiência de vitamina B-12 (Basaran e Rodríguez-Cerezo, 2008b).

As culturas de células vegetais em suspensão têm sido usadas em estudos de produção de proteínas heterólogas que incluem anticorpos recombinantes, fragmentos de anticorpos, enzimas tais como a β -glucuronidase e invertase, proteínas de valor terapêutico tais como interleucina humana (IL)-2 e IL-4, proteína de inactivação do ribossoma, ricina, α_1 -antitripsina humana (revisto por Doran, 2006) e fitase (Li *et al.*, 1997; Pires *et al.*, 2008) que é uma enzima N-glicosilada que quebra fitato indigestível. Comparativamente a sistemas de expressão tradicionais o número de aplicações ainda é relativamente pequeno (Fischer e Emans, 2000). Até à data nenhum produto farmacêutico ainda foi produzido em cultura de células vegetais em suspensão para fins comerciais, embora muitos estudos fundamentais estejam a ser desenvolvidos e várias companhias investiguem a viabilidade comercial deste tipo de sistema. Um exemplo é a produção de glucocerebrosidase (GCD) por células de cenoura transgénicas. Esta enzima é usada no tratamento da doença de Gaucher e já se encontra em ensaios clínicos de fase III. Outro exemplo de produto farmacêutico produzido em culturas de células (tabaco) é a

vacina que protege aves da doença de Newcastle. A companhia *Dow Agrosciences* recebeu a primeira aprovação regulamentar e também reuniu os rigorosos requisitos da FDA para uma vacina veterinária produzida em plantas (Basaran e Rodríguez Cerezo, 2008b).

Tabela 1: Alguns exemplos de produtos farmacêuticos produzidos em plantas (Kaiser, 2008)



| Selected Plant-Made Pharmaceuticals | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------|--------------------|
| Company | Plant | Grown in | Drug or product | Disease | Status |
| Human drugs | | | | | |
| Protalix Biotherapeutics | carrot | cell culture | glucocerebrosidase | Gaucher disease | Phase III trial* |
| Biolex Therapeutics | duckweed | indoor chambers | alpha interferon | hepatitis C | Phase II trial* |
| SemBioSys Genetics | safflower | field | insulin | diabetes | Phase I/II trial † |
| Meristem Therapeutics | corn | field | lipase | cystic fibrosis | Phase III trial † |
| Other products | | | | | |
| Ventria Bioscience | rice | field | lactoferrin, lysozyme | diarrhea | Efficacy trial § |
| Cobento | <i>Arabidopsis</i> | greenhouse | human intrinsic factor | Vitamin B-12 deficiency | Approved †† |
| Planet Biotechnology | tobacco | field | secretory antibody vaccine | tooth decay | E.U. approved |
| Dow AgroSciences | tobacco | cell culture | poultry vaccine | Newcastle disease | USDA approved |
| CIGB, Cuba | tobacco | greenhouse | vaccine purification antibody | hepatitis B | On market |

* Ongoing; † Projected late 2008; § Completed; †† In Ukraine.

Um estudo recente realizado por Basaran e Rodríguez Cerezo (2008a) sobre as actividades de *Molecular Farming* entre 2002 e 2006 baseado na análise de patentes, revelou cinco áreas de pesquisa com maior número de patentes, nomeadamente a área de produtos farmacêuticos e nutracêuticos com 170 patentes (32%), métodos e ferramentas de expressão em plantas como sistemas de produção alternativos com 169 patentes (29%), 102 patentes (17%) associadas a anticorpos, 71 patentes (12%) de moléculas industriais, 48 patentes (8%) de vacinas e 18 patentes (3%) associadas a glicosilação de proteínas. O estudo permitiu ainda constatar um aumento do número de patentes de mais de três vezes sobre o uso de plantas para expressão de proteínas heterólogas ao longo dos anos em análise.

1.5 Plantas como plataforma de produção de proteínas recombinantes

Com os avanços da engenharia genética, actualmente a maioria dos genes podem ser expressos em muitos sistemas diferentes, tornando-se crucial determinar qual o sistema mais vantajoso para a produção de proteínas recombinantes. O sistema de expressão ideal seria

aquele que produzisse o produto em maior quantidade, mais seguro, mais activo biologicamente e com o custo mais baixo (revisto por Daniell *et al.*, 2001).

O uso de plantas transgénicas para a produção em larga escala de proteínas recombinantes tem-se tornado uma alternativa atractiva aos sistemas de produção convencionais tais como bactérias, fungos filamentosos, leveduras, culturas de células de insectos e mamíferos ou animais transgénicos.

O sistema de fermentação bacteriano é o mais bem caracterizado e mais barato. No entanto os produtos produzidos por microrganismos são consideravelmente diferentes dos produtos de origem nativa. O processamento de proteínas eucarióticas é incompleto e limitado a estruturas simples (péptidos, proteínas pequenas), que não necessitem de modificações pós-traducionais ou que estas sejam desnecessárias para a actividade biológica. Por exemplo, a maioria das proteínas humanas glicosiladas usadas como terapêuticos requerem glicosilação e as bactérias não realizam esta modificação pós-traducional. Além disso é frequente a formação de corpos de inclusão quando a acumulação de proteínas é elevada, sendo necessários passos de renaturação para recuperação das proteínas na forma biologicamente activa. Por fim, este sistema ainda apresenta possível contaminação por toxinas bacterianas que têm de ser eliminadas (Boehm *et al.*, 2007).

As leveduras são sistemas eucarióticos que evitam algumas destas desvantagens. *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais estudada e usada para produção de proteínas heterólogas, contudo tem a tendência a hiperglicosilar as proteínas produzidas as quais resultam em N-glicanos do tipo elevada-manose, que são bastante diferentes das estruturas de N-glicanos humanos ou mamíferos. *Pichia pastoris* tem surgido como outro possível sistema de expressão, evitando os problemas de hiperglicosilação (Boehm *et al.*, 2007).

A maioria das proteínas farmacêuticas são produzidas em células de insecto ou de mamíferos devido à capacidade que possuem em realizar a glicosilação de forma semelhante à do hospedeiro nativo, mas são sistemas caros e o *scale-up* é difícil de realizar. Ao uso de animais transgénicos como plataforma de produção estão associados problemas éticos que dificultam a aceitação pública.

Plantas transgénicas estáveis obtidas através de transformação nuclear ou dos cloroplastos representam um dos muitos sistemas possíveis para produção de proteínas heterólogas em plantas. Outros sistemas vegetais incluem culturas de células vegetais transgénicas em suspensão e tecnologias de expressão transiente usando agroinfiltração ou transfecção viral

(revisto por Abranches *et al.*, 2005a; Basaran e Rodríguez-Cerezo, 2008b). O uso de plantas transgênicas é preferido quando se pretende elevados volumes de produção. O sistema transgênico de cloroplastos pode alcançar níveis de expressão extraordinariamente elevados, mas pode ser limitado à produção de proteínas que são correctamente processadas pela maquinaria de modificação pós-tradução dos plastídeos (Abranches *et al.*, 2005a). Os sistemas de expressão transiente (revisto por Twyman *et al.*, 2003) podem ser usados para testar construções de expressão e para a produção rápida de pequenas quantidades de produto para análise funcional do produto antes da transformação estável das plantas.

As plantas apresentam várias vantagens sobre os sistemas de produção convencionais tais como a ausência de endotoxinas, patogêneos humanos e sequências de DNA oncogénicas (revisto por Commandeur *et al.*, 2003), minimizando os riscos para a saúde provocados por contaminação do produto recombinante. Os sistemas vegetais são mais económicos que a infraestrutura industrial baseada no uso de sistemas de fermentação ou em bioreactores. Para a produção de proteínas humanas, as plantas possuem a vantagem de fazerem o processamento das proteínas de forma semelhante às células animais, com apenas algumas diferenças na glicosilação das proteínas, uma vez que possuem mecanismos de modificação pós-traducionais eucarióticos, ao contrário das células procarióticas. Outros factores a favor dos sistemas vegetais incluem potencial para produção em larga escala, produção de biomassa mais económica, eliminação de todos os custos relativamente à purificação e processamento para o caso de produtos administrados oralmente (vacinas comestíveis), disponibilidade da tecnologia para colher e processar plantas e os seus produtos à escala industrial e são fáceis de modificar por engenharia genética. As proteínas recombinantes podem ser direccionadas a determinados compartimentos onde são mais estáveis ou onde sofrem formas particulares de modificação pós-tradução (revisto por Doran, 2006).

Os produtos não farmacêuticos de *Molecular Farming* atingiram mais rapidamente o mercado comparativamente a produtos farmacêuticos, uma vez que não são sujeitos a todas as fases a que os produtos farmacêuticos são submetidos antes de obterem aprovação para entrarem no mercado como um novo medicamento. Alguns exemplos incluem a avidina de clara de ovo de galinha, que foi o primeiro caso comercial de expressão heteróloga em plantas produzida em milho transgênico (Hood *et al.*, 1997), β -glucoronidase (GUS) de *E.coli* e aprotinina em grão de milho transgênico - as duas primeiras são utilizadas em técnicas bioquímicas e a terceira é um

potencial agente terapêutico. Outras proteínas desenvolvidas e comercializadas foram a tripsina, lactoferrina, lisozima, peroxidase, lactase e celulase (Basaran e Rodríguez-Cerezo, 2008b).

1.5.1 Espécies vegetais hospedeiras para *Molecular Farming*

Os avanços da tecnologia de transformação têm proporcionado uma grande variedade de espécies vegetais disponíveis para *Molecular Farming* e que incluem plantas modelo (tabaco, *Arabidopsis*, *Medicago truncatula*), cereais (arroz, trigo, milho, cevada), leguminosas (ervilha, soja, lucerna, amendoim, guandu), frutos (tomate, banana), espécies solanáceas (batata) e oleaginosas (colza, cártamo, camelina) (revisto por Schillberg *et al.*, 2003; Basaran e Rodríguez-Cerezo, 2008b).

A escolha da planta a ser usada depende de vários factores que envolvem os seus métodos de cultivo, a facilidade com que é transformada, o custo associado ao crescimento, produção e processamento do tecido alvo, existência de parentes selvagens e o grau de cruzamento com parentes selvagens (Basaran e Rodríguez-Cerezo, 2008b).

O tabaco é fácil de manipular geneticamente e propicia grandes quantidades de biomassa, obtendo-se elevados rendimentos de produto, contudo apresenta a desvantagem de produção de alcalóides tóxicos e nicotina (revisto por Commandeur *et al.*, 2003; Basaran e Rodríguez-Cerezo, 2008b) que têm de ser removidos durante o pós-processamento. Por outro lado produz um grande número de sementes que têm menos compostos fenólicos e uma mistura menos complexa de proteínas e lípidos comparativamente às folhas verdes. Outros sistemas de expressão vegetais que têm emergido mais recentemente são *Lemna minor* (lentilha d'água), *Physcomitrella patens* (musgo), *Chlamydomonas reinhardtii* (alga verde) ou culturas de células em suspensão de plantas superiores (revisto por Liénard *et al.*, 2007).

1.5.2 Modificações pós-traducionais

Uma das limitações apresentada pelos sistemas de expressão vegetais é o impacto que a glicosilação específica de plantas pode ter na actividade, imunogenicidade e alergenicidade de produtos farmacêuticos produzidos em plantas glicosiladas (revisto por Liénard *et al.*, 2007).

A grande maioria das proteínas terapêuticas é frequentemente sujeita a várias modificações pós-traducionais que incluem glicosilação, fosforilação, metilação, ADP-ribosilação, oxidação e glicação e também modificações proteolíticas e não enzimáticas (Gomord e Faye, 2004). A glicosilação (ligação covalente de oligossacáridos a cadeia polipeptídica) é a modificação mais frequente, e pode afectar a eficácia funcional, propriedades físico-químicas, resistência a desnaturação térmica, protecção de degradação por proteases, solubilidade e imunogenicidade

da proteína eucariótica significativa para as suas aplicações terapêuticas (Basaran e Rodríguez-Cerezo, 2008b; Gomord e Faye, 2004). Esta modificação desempenha um papel importante no *folding* da proteína, estabilidade, semi-vida e actividade biológica que é de particular importância para produção biofarmacêutica. Os açúcares estão ligados a um átomo de azoto da asparagina da cadeia polipeptídica (denominada uma ligação N) ou ao átomo de oxigénio na cadeia lateral da serina, treonina ou hidroxilprolina (denominada uma ligação O) (Faye *et al.*, 2005).

À semelhança de outros eucariotas, a N-glicosilação de proteínas em células vegetais tem início no retículo endoplasmático em concomitância com a tradução. É adicionado um oligossacárido precursor constituído por N-acetil-glucosamina, manose e glucose ([Glc3Man9GlcNAc]₂) ao grupo amina de um resíduo de asparagina específico (asparagina-X-serina ou asparagina-X-treonina). Este grupo de hidratos de carbono denomina-se N-glicanos. Ao longo do transporte através da via secretora, o oligossacárido sofre várias reacções de maturação no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi que envolvem a adição e remoção de açúcares (Gomord e Faye, 2004).

As duas principais diferenças na glicosilação entre as células animais e vegetais verifica-se aquando da maturação dos N-glicanos no complexo de Golgi das células vegetais, que inclui a adição dos resíduos $\alpha(1,3)$ -fucose e $\beta(1,2)$ -xilose ausentes em mamíferos, e não ocorre a adição dos resíduos terminais de galactose e de ácido siálico (Gomord e Faye, 2004), sendo que a presença de ácido siálico altera a carga global das proteínas e em determinados casos pode afectar a actividade biológica e o tempo de semi-vida *in vivo* da proteína (Abranches *et al.*, 2005a). Os N-glicanos em plantas podem ser divididos em quatro grupos: oligo-manose, tipo complexo, tipo híbrido e paucimanosídicos. Os N-glicanos oligo-manose (Man5-Man9) formados no retículo endoplasmático têm a mesma estrutura em glicoproteínas produzidas em plantas e em mamíferos, mas N-glicanos tipo-complexo formados no complexo de Golgi são estruturalmente diferentes em plantas e mamíferos (Liénard *et al.*, 2007). Os N-glicanos do tipo complexo que possuem os resíduos de $\alpha(1,3)$ -fucose e $\beta(1,2)$ -xilose têm-se demonstrado imunogénicos na maioria dos mamíferos de laboratório, ao elicitarem a formação dos anticorpos IgE e IgG específicos de glicanos em plantas (Liénard *et al.*, 2007).

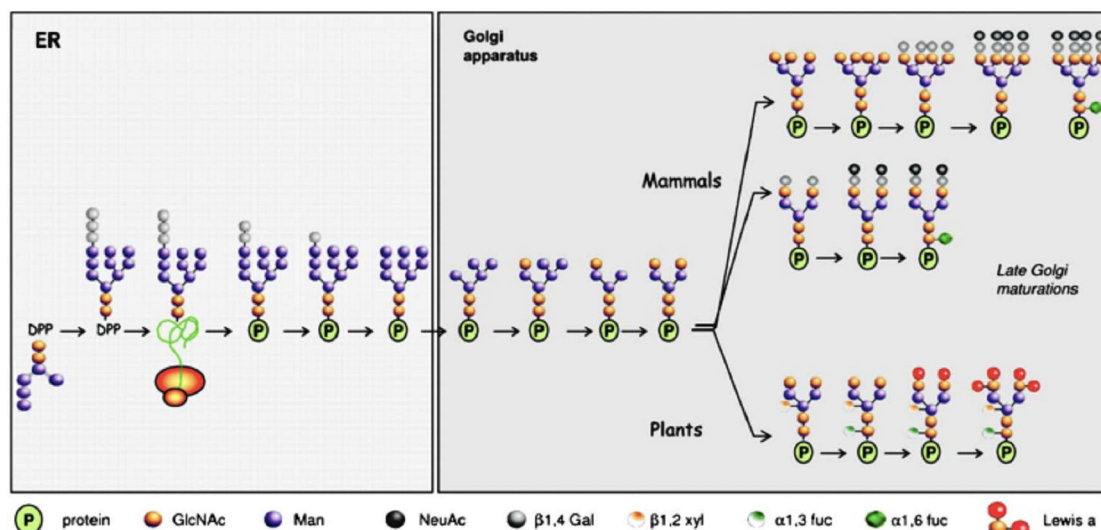


Figura 1: Adição e processamento de N-glicanos no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi em plantas e mamíferos (Liénard *et al.*, 2007)

1.5.3 Estratégias para humanizar N-glicanos de proteínas produzidas em plantas

Para a produção de biofármacos em plantas é necessário modificar o padrão de glicosilação nas plantas para que o produto final seja semelhante ao original. Algumas estratégias já têm sido desenvolvidas de forma a “humanizar” as estruturas dos glicanos. Exemplos de estratégias que têm sido testadas são a ligação *in vitro* de glicanos a proteínas recombinantes usando galactosiltransferases bacterianas modificadas (Bernatchez *et al.*, 2007), a co-expressão da enzima β(1,4)-galactosiltransferase humana com o gene de interesse em plantas transgênicas de forma a produzir proteínas recombinantes com os glicanos de galactose. Esta última estratégia foi atingida com sucesso por Bakker *et al.* (2001) que expressaram a enzima humana β(1,4)-galactosiltransferase em tabaco. As vias biossintéticas das plantas também têm sido modificadas para possibilitar a produção de ácido siálico. Paccalet *et al.* (2007) expressaram em células de tabaco Bright Yellow 2 (BY2) e em *Medicago sativa* (lucerna) os genes que codificam as enzimas Neu5Ac (ácido N-acetil-neuramínico) liase de *Escherichia coli* e a Neu5Ac sintase (neuB2) de *Campylobacter jejuni*. Castillo *et al.* (2008) geraram plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* expressando três enzimas fundamentais na via biossintética de ácido siálico e Sourrouille *et al.* (2008) modificaram lucerna para expressar a galactosiltransferase humana e gerar N-glicanos galactosilados.

As abordagens descritas anteriormente envolvem a adição de carboidratos que as plantas não têm, outras abordagens consistem em remover carboidratos específicos das plantas que podem provocar imunogenicidade em humanos, como por exemplo a inibição das enzimas

fucosiltransferase e xilosiltransferase. Os resíduos de xilose e fucose têm demonstrado ser os principais epítomos responsáveis pela alergenicidade de glicoproteínas em humanos (Doran, 2006), no entanto já existem vários exemplos de plantas modificadas para evitar os resíduos $\beta(1,2)$ -xilose e $\alpha(1,3)$ -fucose. Strasser *et al.* (2004) realizaram *knock-outs* em *Arabidopsis thaliana* para produzir N-glicanos sem os resíduos $\beta(1,2)$ -xilose e $\alpha(1,3)$ -fucose. Cox *et al.* (2006) silenciaram as actividades das enzimas $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferase e $\beta(1,2)$ -xilosiltransferase na planta aquática *Lemna minor*, de forma a produzir anticorpos monoclonais sem os N-glicanos específicos das plantas, Sourrouille *et al.* (2008) modificaram lucerna para inactivar as enzimas $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferase e $\beta(1,2)$ -xilosiltransferase e Strasser *et al.* (2008) silenciaram os genes das enzimas $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferase e $\beta(1,2)$ -xilosiltransferase em *Nicotiana benthamiana*. Outra possível abordagem inclui a retenção de glicoproteínas recombinantes no R.E. adicionando a sequência específica C-terminal KDEL, para evitar as modificações específicas das plantas no Golgi. No entanto, esta abordagem quando aplicada às culturas de células vegetais impede a extracção da proteína a partir do meio e pode originar custos adicionais no processamento *downstream* (Doran, 2006).

1.5.4 Distribuição subcelular de proteínas

O compartimento celular onde a proteína acumula influencia os processos de conformação e modificações pós-traducionais que contribuem para a estabilidade da proteína e consequentemente para o rendimento final. Assim sendo, o direccionamento subcelular pode ser usado para aumentar o rendimento de proteínas recombinantes.

Quando a proteína é direccionada para a via secretora verificam-se níveis de expressão mais elevados. Para a proteína ser secretada adiciona-se um péptido sinal N-terminal no vector de expressão. No sistema endomembranar, as proteínas seguem a via padrão e são secretadas para o apoplasto. As proteínas também podem ser retidas no R.E. que oferece um ambiente oxidante, com grande quantidade de chaperonas e com poucas proteases, proporcionando uma elevada estabilidade para as proteínas. Os padrões de glicosilação no R.E. são bastante homogêneos. Para que a proteína acumule no R.E. é necessário adicionar a sequência de aminoácidos KDEL (lisina-ácido aspártico-ácido glutâmico-leucina) C-terminal. Em alguns casos, isto resulta numa retenção muito eficiente no R.E., mas por vezes as proteínas são direccionadas para o complexo de Golgi. A via e o local de acumulação que a proteína recombinante toma nem sempre são os esperados, o que pode ter impacto na qualidade da proteína (Abranches *et al.*, 2008; Arcalis *et al.*, 2004; González-Melendi *et al.*, 2009).

1.6 *Arabidopsis thaliana* como sistema de expressão

Culturas de células em suspensão têm sido preparadas a partir das seguintes espécies vegetais: *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, *Taxus cuspidata*, *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Medicago sativa* (lucerna), *Oryza sativa* (arroz), *Solanum lycopersicum* (tomateiro) e *Glycine max* (soja) (revisto por Hellwig *et al.*, 2004).

Células em suspensão de tabaco, em particular as linhas BY-2, são as mais populares devido às suas favoráveis características de crescimento e aos métodos de transformação e propagação já bem estabelecidos. Porém, é importante explorar diversas linhas celulares de forma a atingir as condições mais favoráveis que incluem melhores cinéticas de crescimento, níveis de expressão superiores, secreção mais eficiente e outras vantagens relativamente à compatibilidade do processo (revisto por Hellwig *et al.*, 2004).

Arabidopsis thaliana é uma planta herbácea que pertence à família da mostarda (Brassicaceae), sendo um dos organismos modelo para o estudo da genética molecular das plantas e a primeira planta cujo genoma foi completamente sequenciado ('The Arabidopsis Genome Initiative', 2000). Alguns atributos que tornam esta planta particularmente adequada para investigação incluem: (1) ciclo de vida muito curto de cerca de 4 a 6 semanas, evitando longos períodos de espera de desenvolvimento de outras plantas; cada planta possui o potencial para produzir mais que 10,000 sementes; (2) facilidade de cultivo em laboratório; (3) é facilmente transformada com *Agrobacterium*, células de *Arabidopsis* já têm sido cultivadas em meio de cultura e plantas já foram regeneradas destas células; (4) genoma pequeno e quantidade mínima de DNA repetitivo, que facilita a identificação, clonagem e sequenciação de genes e (5) é autogâmica, permitindo facilmente obter novas mutações (ver e.g. 'The Arabidopsis Genome Initiative', 2000).

A espécie *Arabidopsis thaliana* é considerada um bom modelo de estudo para *Molecular Farming* porque é fácil de transformar e manipular em laboratório.

O método de infiltração por vácuo com *Agrobacterium* tornou possível transformar *Arabidopsis thaliana* sem a necessidade de cultura de tecidos vegetais ou regeneração. Mais recentemente tem sido desenvolvido um método de transformação modificado denominado por *floral dip* (Clough e Bent, 1998), que é na realidade um método simplificado de transformação de *Arabidopsis thaliana* mediado por *Agrobacterium* e que elimina o processo de infiltração por vácuo. Este foi o método adoptado para transformar a planta modelo a partir da qual este projecto foi desenvolvido. Tecidos florais em desenvolvimento são infiltrados com uma solução contendo *Agrobacterium tumefaciens*, sacarose e um surfactante (Clough e Bent, 1998).

1.7 Eritropoietina como proteína modelo

Neste projecto é usada a eritropoietina humana recombinante (hrEPO) como proteína modelo para avaliar a eficiência de culturas de células em suspensão de *Arabidopsis* como plataforma de produção de proteínas recombinantes.

A EPO é uma hormona glicoprotéica que regula a formação de eritrócitos em mamíferos, sendo produzida no rim de adultos e no fígado fetal de mamíferos e posteriormente secretada para a corrente sanguínea, actuando na medula óssea para induzir a diferenciação de células hematopoiéticas. É um importante biofármaco usado no tratamento de anemia causada por insuficiência renal, anemia associada a quimioterapia, a síndrome de imunodeficiência adquirida, bem como em outros tipos de anemia, sendo um produto de valor considerável para a indústria farmacêutica (Cheon *et al.*, 2004; Conley *et al.*, 2009).

A proteína glicosilada migra em SDS-PAGE entre 34 e 38 kDa, correspondendo cerca de 40% da sua massa molecular a cadeias de oligossacáridos. O DNA genómico que codifica para o gene humano da EPO é composto por quatro intrões e cinco exões, que codificam 193 aminoácidos. Um péptido sinal de 27 aminoácidos é clivado durante a secreção originando um péptido de 166 aminoácidos, incluindo quatro cisteínas que formam duas ligações dissulfureto. A hormona existe como uma mistura heterogénea de glicoformas. Apresenta três sítios de glicosilação N-ligados [asparagina-24 (Asn24), ASn38 e Asn83] e um O-ligado [Serina-126 (Ser126)] (Conley *et al.*, 2009).

A ausência de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) provoca a rápida metabolização hepática, influenciando a semi-vida biológica da proteína na circulação e a sua eficácia terapêutica (Weise *et al.*, 2007; Conley *et al.*, 2009).

Além do estabelecido efeito em hematopoiese, a EPO também tem propriedades de protecção de tecidos. A produção eficiente de eritrócitos (eritropoiese) requer a presença contínua de EPO, enquanto uma breve exposição de EPO é suficiente para neuroprotecção *in vitro* (Erbayraktar *et al.*, 2003). Quando a EPO é produzida em células de mamífero é necessário remover o ácido siálico de forma a diminuir o tempo de semi-vida da proteína, evitando uma excessiva hematopoiese que provocaria efeitos colaterais indesejáveis, tais como o aumento da pressão arterial e trombose. O uso de plantas como plataforma de produção beneficia da capacidade natural das plantas em produzirem EPO asialilada sem necessidade de derivados de EPO que adicionaria mais custos de produção (Conley *et al.*, 2009).

Actualmente estão a ser estudadas novas aplicações de rhEPO, na redução da inflamação associada à isquemia em casos de lesão cerebral, da coluna vertebral, insuficiência renal aguda

e enfarte do miocárdio, como consequência da descoberta das suas actividades na protecção de tecidos e anti-apoptóticas (Erbayraktar *et al.*, 2003; Leist *et al.*, 2004, Conley *et al.*, 2009).

1.7.1 Sistemas de expressão convencionais de EPO

A EPO recombinante tem sido produzida em células de mamíferos (COS-1 e CHO) e tem sido expressa experimentalmente em células de insectos, leveduras, bactérias e no leite de cabras transgénicas. No caso dos sistemas não mamíferos, não existem alguns carboidratos comparativamente à EPO humana, tornando a EPO recombinante biologicamente inactiva (Conley *et al.*, 2009). Para exercer actividade hematopoiética *in vivo*, a EPO necessita de modificações pós-traducionais complexas. O seu potencial terapêutico é associado com a semi-vida da glicoproteína que depende da presença de ácidos siálicos terminais nas cadeias de oligossacáridos de EPO que evitam a sua remoção por receptores de manose e galactose no fígado. Por esta razão toda a rhEPO usada terapêuticamente é produzida em culturas de células de mamíferos que possuem a capacidade de realizar N-glicosilação como os humanos, incluindo a capacidade de adicionar ácido siálico terminal. Estes processos são tecnicamente complexos e caros, reduzindo as quantidades de EPO que podem ser produzidas. Existe uma forte necessidade de descobrir sistemas alternativos de produção de EPO que sejam mais eficientes para fazer face às necessidades da indústria farmacêutica (Toledo *et al.*, 2006; Çelik *et al.*, 2007 e Hamilton *et al.*, 2006).

1.7.2 Sistemas de expressão vegetais de EPO

Até ao momento as descrições da expressão transgénica da proteína EPO em plantas foram a produção em linhas celulares BY2 de tabaco (Matsumoto *et al.*, 1995), em plantas de *Arabidopsis* (Cheon *et al.*, 2004), tabaco (Cheon *et al.*, 2004; Conley *et al.*, 2009) e no musgo *Physcomitrella patens* (Weise *et al.*, 2007).

Matsumoto *et al.* (1995) geraram linhas celulares transgénicas BY2 de tabaco contendo cDNA da hEPO, incluindo a sequência do péptido sinal endógeno sob o controlo do promotor 35S. Detectaram rhEPO no extracto de células e no meio de cultura de protoplastos obtidos de células de tabaco transformadas, mas não em meio de cultura de células BY-2 que possuíam parede celular. Os rendimentos obtidos foram muito baixos (0,0026% da proteína solúvel total) possivelmente em consequência da sub-expressão do transgene em função do vector de

expressão e promotor escolhidos que não foram otimizados para obter elevados níveis de expressão em células vegetais.

Matsumoto *et al.* (1995) ainda demonstraram que a EPO apresentava apenas actividade hematopoiética *in vitro* induzindo a diferenciação e proliferação de células eritróides, no entanto não tinha actividade biológica *in vivo*, provavelmente devido a ausência de resíduos de ácido siálico que diminui o tempo de semi-vida da proteína na circulação sanguínea.

Cheon *et al.* (2004) observaram alterações morfológicas nas plantas quando rhEPO foi sobre-expressa em tabaco e *Arabidopsis*. Linhas de tabaco transformadas com cDNA de hEPO apresentaram crescimento vegetativo retardado e esterilidade masculina foi induzida em ambas as plantas transgênicas. No entanto um estudo recente não confirma as alterações morfológicas observadas em tabaco (Musa *et al.*, 2009).

No estudo efectuado por Weise *et al.* (2007) foram criados novos vectores de expressão baseados num promotor derivado do gene de ubiquitina de *Physcomitrella* para a expressão transiente e estável da hEPO no musgo *P. patens wild-type* e na linha mutante Δ -fuc-*t* Δ -xyl-*t*, cujos N-glicanos do tipo complexo eram destituídos de β (1,2)-xilose e α (1,3)- fucose.

Protoplastos *wild-type* de *P. patens* obtidos a partir de culturas em frascos de musgo foram transientemente transformados para avaliar a viabilidade de expressão de rhEPO por células de musgo e testar as novas construções usadas para expressão da proteína antes de ser realizada a transformação estável.

Para realizar mais estudos foram preparados protoplastos a partir de culturas em bioreactor de *wild-type* ou duplo mutante de Δ -fuc-*t* Δ -xyl-*t* *Physcomitrella*. Para obterem elevada concentração de produto no sistema transiente desenvolveram um protocolo, segundo o qual atingiram níveis elevados de proteína de cerca de 0,5 μ g/ml. Linhas mutantes Δ -fuc-*t* Δ -xyl-*t* de *Physcomitrella* foram usadas para transformação estável e secretaram EPO que atravessou a parede celular e acumulou no meio de cultura, demonstrando, pela primeira vez, a capacidade de rhEPO ser secretada para o meio de cultura, sem ficar aprisionada na parede celular como tinha ocorrido no estudo levado a cabo por Matsumoto *et al.* (1995). A planta com maior nível de expressão foi usada para cultivo em cultura em fotobioreactores de 5 e 10 L. Atingiram-se concentrações elevadas de rhEPO acima de 250 μ g/g de peso seco após 6 dias. rhEPO secretada para o meio de cultura demonstrou elevada pureza com apenas uma pequena quantidade de proteínas endógenas do musgo.

O péptido sinal derivado de plantas foi processado correctamente em *Physcomitrella* Δ -*fuc-t* Δ -*xyl-t* mutante. Os três locais de N-glicosilação da rhEPO foram ocupados por N-glicanos do tipo complexo sem os resíduos de fucose e xilose específicos das plantas. Em contraste com o estudo anteriormente realizado por Cheon *et al.* (2004) as estirpes transgénicas de musgo utilizadas não apresentaram uma alteração de fenótipo visível prococada pela expressão de rhEPO.

Recentemente, Conley *et al.* (2009) produziram EPO humana em tabaco e demonstraram pela primeira vez que a proteína produzida em plantas possui actividade biológica na protecção de tecidos. Esta descoberta é muito importante, porque além da função conhecida da EPO em hematopoiese, também poderá ser usada na protecção de tecidos, evitando a morte celular.

Para além disto, os autores deste estudo, ainda avaliaram algumas estratégias de forma a aumentar a quantidade de EPO em tecidos vegetais. Os resultados por eles obtidos indicam que a EPO acumula em maior quantidade quando é direccionada ao retículo endoplasmático e que o péptido sinal de EPO humana é mais eficiente do que o péptido sinal de tabaco.

1.8 Objectivos

Culturas de células vegetais em suspensão têm surgido como uma plataforma de produção de proteínas recombinantes alternativa a sistemas mais convencionais. Os pontos críticos que determinam a viabilidade económica deste tipo de sistema de produção incluem o nível de expressão da proteína, o crescimento celular e os processos de purificação. Tendo em vista a optimização destes pontos para que as culturas de células em suspensão possam vir a competir comercialmente, particularmente com os sistemas baseados em culturas de células de mamífero já bem estabelecidos, torna-se imperativo estudar e explorar diversas linhas celulares obtidas de diferentes espécies vegetais com o intuito de descobrir a linha celular mais favorável. Para tal, neste projecto, culturas em suspensão de células de *Arabidopsis thaliana* serão usadas para estudar a expressão de proteínas recombinantes, usando como modelo a eritropoietina humana recombinante (EPO) que apresenta um padrão de glicosilação complexo. Não existe nenhum estudo documentado de culturas de células de *Arabidopsis* para produção de proteínas recombinantes, pelo que este trabalho é inovador no sentido de testar a possibilidade destas culturas serem mais favoráveis do que culturas celulares de outras espécies.

Mais pormenorizadamente, linhas transgénicas de *Arabidopsis* que se encontram na terceira geração e obtidas por transformação mediada por *Agrobacterium* usando dois vectores distintos para diferente localização da proteína: formas secretada para o apoplasto e retida no retículo

endoplasmático, serão comparadas em termos de rendimento e recuperação do produto. O presente trabalho tem como principais objectivos avaliar o potencial de culturas de células em suspensão de *Arabidopsis* para a produção de proteínas, realizando uma análise integrativa do comportamento das culturas em termos de cinéticas de crescimento, produção de biomassa, estabilidade das linhas celulares, rendimento e recuperação do produto. Pretende-se ainda comparar os resultados obtidos desta análise com os de outra espécie em estudo no laboratório, *Medicago truncatula*, para permitir uma melhor visão de quais os factores específicos de espécies que afectam a eficiência de uma linha celular.

2. Materiais e métodos

Este projecto envolveu três fases principais. (1) Inicialmente foi realizado um *screening* das plantas transgênicas de *Arabidopsis* de terceira geração de forma a seleccionar as linhas com maior nível de expressão, para as duas formas de rEPO. (2) As linhas escolhidas foram usadas para estabelecer culturas de células em suspensão. (3) As linhas celulares estabelecidas foram então usadas para análise em termos de cinéticas de crescimento, rendimento, estabilidade, e ainda para purificação e caracterização do produto recombinante.

2.1 Material vegetal

Plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* expressando eritropoietina recombinante humana foram obtidas por transformação mediada por *Agrobacterium* (método floral dip), usando dois vectores de expressão distintos para diferente localização da proteína: formas secretada para o apoplasto e retida no retículo endoplasmático. Ambos os vectores usados na transformação continham um péptido sinal para direccionar a proteína para a via secretora, uma cauda de 6 histidinas na extremidade C-terminal da proteína e possuíam ainda uma marca de selecção para conferir resistência ao antibiótico canamicina. Um dos vectores continha a sequência de aminoácidos KDEL para reter a proteína no R.E. (EPO-ERH), enquanto o outro não tinha a sequência KDEL de forma direccionar a proteína para o espaço extracelular ou para o apoplasto (EPO-AH). Após a transformação, as plantas foram rastreadas por PCR para confirmar a presença do transgene.

A construção dos vectores de expressão, a transformação de *Arabidopsis* e o *screening* por PCR foram realizados anteriormente no laboratório.

2.1.1 Vectores otimizados para transformação de plantas

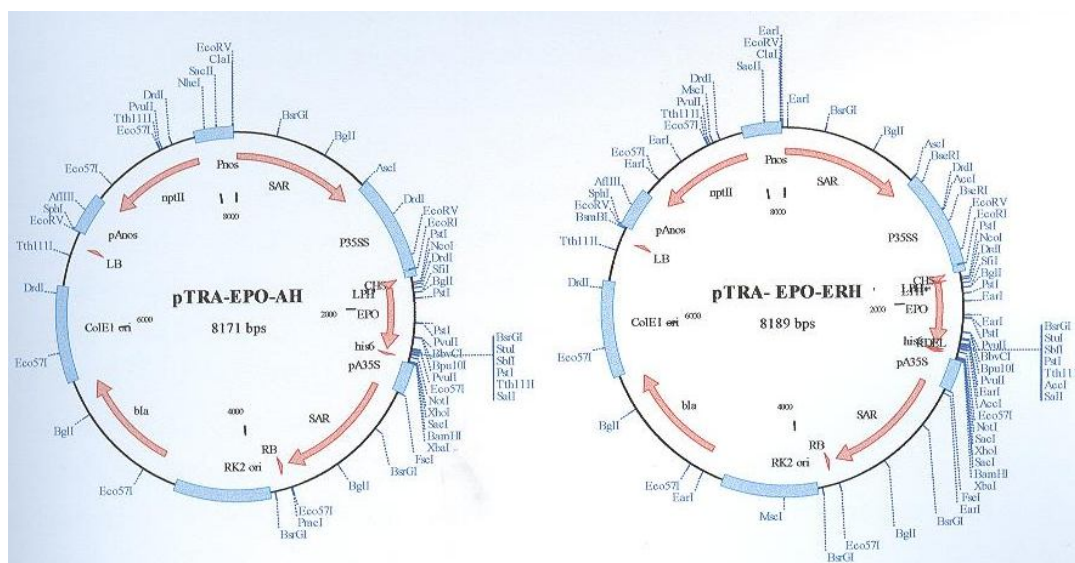


Figura 2: Mapas dos vectores de expressão pTRA-EPO-AH e pTRA-EPO-ERH

O cDNA codificante da eritropoietina, obtido a partir de RNA mensageiro para a eritropoietina fetal humana foi digerido com enzimas de restrição de modo a remover o péptido sinal presente, para a secreção em humanos. Em seguida o fragmento resultante (EPO) foi clonado na região do T-DNA do vector de expressão pTRA (T. Rademacher, Aachen, Alemanha), sob o controlo do promotor constitutivo 35SS, uma versão melhorada do promotor 35S do vírus mosaico da couve-flor. A jusante do promotor encontra-se uma região que não é traduzida (CHS – 5'-UTR de Chalcone Sintase) e confere estabilidade ao RNA mensageiro (ver figura 3). A montante do cDNA da EPO encontra-se o péptido sinal LPH, que é um péptido sinal de murino (mAB24) cujo *codon usage* foi otimizado para plantas. A jusante do cDNA da EPO está um *tag* de fusão C-terminal constituído por 6 resíduos de histidinas (His-*tag*). No caso do vector pTRA-EPO-AH estas são as principais características do T-DNA e pretende-se que a EPO seja secretada para o apoplasto (EPO-AH). Por outro lado o vector pTRA-EPO-ERH tem uma região adicional a jusante do His *tag*, o sinal KDEL para a retenção no retículo endoplasmático (EPO-ERH).

A flanquear a cassette de expressão da EPO estão as sequências MARs Rb7 de *Nicotiana tabacum*. As sequências MARs evitam o silenciamento dos transgenes e conferem uma maior estabilidade de expressão (Abranches *et al.*, 2005b).

Dentro da região do T-DNA está presente a cassette de resistência à canamicina com o gene *nptII* sob o controlo do promotor para a nopalina sintase.

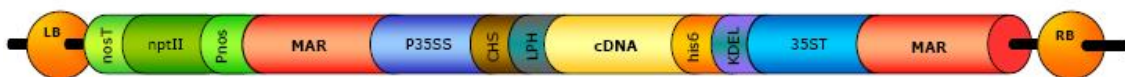


Figura 3: T-DNA de EPO-ERH (com KDEL)

2.1.2 Geração de linhas transgênicas homozigóticas de *Arabidopsis*, na terceira geração, expressando EPO

Sementes de várias linhas de *Arabidopsis* transformada (EPO-ERH e EPO-AH) de segunda geração foram esterilizadas 5 minutos em lixívia a 0,05% (v/v) e Tween 20 a 0,0012% (v/v), lavadas duas vezes em água destilada estéril (5 minutos cada lavagem), seguidas por 5 minutos de incubação em etanol a 70% (v/v), lavadas mais duas vezes em água destilada estéril e por fim ressuspensas em água destilada estéril. As sementes foram colocadas a germinar em placas de Petri com meio (Murashige & Skoog, MS, Duchefa) suplementado com sacarose (10g/l), pH ajustado a 5,8 e solidificado com Micro Agar (7g/l).

A canamicina é um antibiótico que foi usado para seleccionar as plantas portadoras do transgene. Este antibiótico é termolábil, razão pela qual foi esterilizado por filtração e adicionado ao meio já autoclavado, na concentração de 100 mg/l. O meio contendo canamicina foi distribuído por placas de Petri, sendo todo o procedimento efectuado na câmara de fluxo laminar para manter as condições de esterilidade. Apenas as sementes portadoras do transgene germinaram no meio contendo canamicina. Sendo que as plantas de terceira geração pela Lei de Mendel são homozigóticas, as sementes deveriam germinar na totalidade. Este procedimento foi efectuado para confirmar que as plantas eram realmente de terceira geração e portadoras do gene da EPO.

2.2 Screening das plantas transgênicas de terceira geração

2.2.1 Obtenção do extracto proteico total

Introduziram-se folhas de *Arabidopsis* de cada linha (2-3 folhas) num *eppendorf* pré-pesado. O peso fresco foi determinado pela subtracção do correspondente peso ao *eppendorf*.

As folhas foram maceradas directamente nos *eppendorfs* utilizando um pilão, em azoto líquido para manter o extracto a temperatura baixa, de modo a evitar a alteração do conteúdo proteico. A maceração foi realizada muito rapidamente sem que as folhas fossem descongeladas, até

obter um pó muito fino. Foi adicionado tampão de extracção (100 mM ácido ascórbico; 500 mM NaCl ; 5 mM β - Mercaptoetanol; pH 8,0) na proporção de 10 μ l de tampão por mg de peso fresco e foi agitado no vórtex até descongelar. Fez-se uma centrifugação (Heraeus, Sepatech) a 17000 rpm, a 4°C durante 20 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo que foi guardado a -20°C.

2.2.2 Dot-blot para confirmação da presença de proteína

Para confirmar a presença de proteína recombinante utilizou-se a técnica de *Dot-blot*. Esta técnica consiste na imunodeteção da proteína em extracto total imobilizada em membrana. Para tal elaborou-se uma grelha na membrana de nitrocelulose com um lápis para indicar a região do *blot*. Usando uma micropipeta com uma ponta de boca estreita, colocou-se 4 μ l de amostra na membrana, no centro da grelha. Cada amostra foi aplicada lentamente para minimizar a área de penetração (geralmente 3-4 mm de diâmetro). Deixou-se secar a membrana (5-10 minutos) e em seguida foram bloqueados potenciais locais de ligações inespecíficas por imersão da membrana em BSA a 5% em PBST durante 40 minutos a temperatura ambiente. Usou-se uma placa de Petri como câmara de reacção. Após o bloqueio a membrana foi lavada com PBST agitando 2-3 vezes e ficou a incubar com o anticorpo primário Ab anti-rhEPO (Sigma) na diluição 1:250 durante 40 minutos a temperatura ambiente e com agitação. Após a incubação a membrana foi lavada três vezes com PBST, cada lavagem teve a duração de 5 minutos. De seguida incubou-se com o anticorpo secundário anti-soro de coelho (Sigma) na diluição 1:4000 conjugado com a fosfatase alcalina durante 40 minutos a temperatura ambiente. Lavou-se três vezes com PBST, uma vez durante 10 minutos e duas vezes durante 1,5 minutos. Detectou-se de forma idêntica como para *Western blotting* (secção 2.6).

2.2.3 Preparação de amostras para SDS-PAGE

As amostras das soluções de extracção das linhas da EPO-AH foram preparadas em tampão de amostra azul bromofenol (ver anexo) concentrado 4 vezes, a mistura foi colocada num banho a 100°C durante 10 minutos para as proteínas desnaturarem. O volume total carregado em cada poço foi 30 μ l (7,5 μ l de tampão de amostra e 22,5 μ l de amostra).

As amostras de extracção das linhas da EPO-ERH foram concentradas por precipitação com 4 volumes de etanol 100% durante 3 horas a -20°C. Em seguida centrifugou-se a 10000 x g durante 10 min a 4°C. Ressuspendeu-se o *pellet* depois de seco em tampão de amostra concentrado 1 vez, aqueceu-se a mistura por 10 min a 100°C, centrifugou-se e aplicou-se no gel.

2.3 Preparação do gel de poliacrilamida para SDS-PAGE

Preparou-se o gel de resolução (12% de acrilamida). Misturou-se cuidadosamente e pipetou-se imediatamente a solução entre as placas de vidro até uma altura de aproximadamente 6 cm. Colocou-se uma camada de 1 ml de isopropanol de forma a obter uma superfície plana. Deixou-se polimerizar e removeu-se o isopropanol com papel absorvente. Em seguida preparou-se o gel de concentração. Este gel permite o alinhamento das proteínas para que possam iniciar a corrida a partir do mesmo ponto e consequentemente serem separadas de acordo com a sua massa molecular no gel de resolução. Misturou-se cuidadosamente, encheu-se o espaço entre as placas com esta solução e colocaram-se os pentes. Após a polimerização completa retiraram-se os pentes.

Tabela 2: Preparação do gel de concentração e do gel de resolução

| Solução stock | Gel de concentração (ml) | Gel de resolução (ml) |
|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| Água | 2,82 | 3,98 |
| Tampão de concentração | 1,25 | - |
| Tampão de resolução | - | 1,25 |
| SDS a 10% | 0,05 | 0,1 |
| Acrilamida/Bisacrilamida 30:0.8 | 0,625 | 4,2 |
| TEMED | 0,005 | 0,005 |
| Persulfato de amónio 1,5% | 0,25 | 0,5 |
| Total (ml) | 5 | 10 |

Após a montagem do apparatus (Mini-Protean® 3Cell, Bio Rad), adicionou-se tampão de corrida (25 mM Tris base, 192 mM Glicina e SDS a 0,1%) até preencher o espaço entre os dois géis e cobrir os eléctrodos, em seguida as amostras foram carregadas nos poços com uma seringa de 50 µl (Hamilton). No primeiro poço foi carregado o marcador de massas moleculares Low Range (BioRad).

O tanque foi exposto a uma voltagem de 180 V e a uma amperagem constante de 30 mA (para dois géis em simultâneo), durante cerca de 90 minutos.

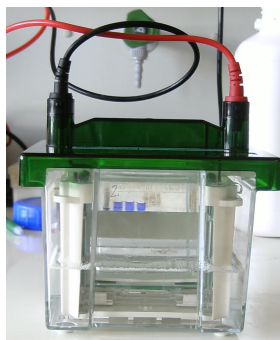


Figura 4: Tanque Mini-Protean® 3Cell Bio-Rad com amostras a migrar

2.4 Coloração do gel de poliacrilamida com azul de Coomassie

Um dos géis foi corado com o corante azul de Coomassie G250 (metanol a 45% (v/v), H₂O a 45% (v/v), ácido acético a 10% (v/v) e Coomassie a 0,1 % (v/v)) durante cerca de 90 minutos com agitação ligeira. De seguida procedeu-se à lavagem com o descorante (metanol a 45% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v)) durante 40 minutos, com agitação ligeira, mudando frequentemente o descorante. O outro gel foi usado para fazer a transferência das proteínas separadas por SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose. As imagens dos géis e das membranas foram digitalizadas num scanner.

2.5 Transferência das proteínas do gel de poliacrilamida-SDS para suporte sólido

A transferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose foi uma transferência semi-seca. Os papéis de filtro, a membrana de nitrocelulose Hybond-C (0,45 micron, Amersham) e o gel foram imersos num tampão de transferência de proteínas (ver anexo) durante alguns minutos. A sanduíche foi montada no *trans-blot sd (semi-dry transfer cell, Bio-Rad)*; O primeiro papel de filtro extra-grosso pré-cortado (Bio-Rad) foi colocado no aparelho, em seguida colocou-se a membrana de nitrocelulose (8 x 6 cm) e em cima desta o gel de poliacrilamida. Finalmente foi colocado outro papel de filtro no topo da sanduíche. Retirou-se o excesso de tampão e fechou-se o aparelho. Aplicou-se uma corrente eléctrica constante de 18 V com intensidade de 200 mA durante 25 minutos para que ocorresse transferência de proteínas.

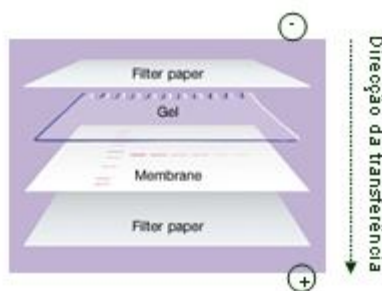


Figura 5: Esquema representativo de montagem de uma transferência semi-seca (Adaptado da Bio-Rad)

2.6 Imunodeteção de proteínas

De modo a aumentar a especificidade e a sensibilidade do ensaio, a membrana foi incubada com uma solução contendo proteínas que bloqueiam todos os potenciais sítios de ligação inespecífica a proteínas, impedindo as interações não específicas entre a membrana e o anticorpo usado para a detecção da proteína alvo. Para tal, após a transferência, a membrana foi imersa em 10 ml de solução bloqueadora contendo leite em pó magro a 5% e BSA (Albumina do soro humano, Sigma) a 3% em PBST durante pelo menos uma hora a temperatura ambiente, com agitação.

Posteriormente ao bloqueio a membrana foi lavada três vezes com PBST, cada lavagem teve a duração de 5 minutos. De seguida foi colocada em PBST contendo o anticorpo primário Ab anti-rhEPO (Sigma) na diluição 1:250, ficando a incubar *overnight* a 4°C sem agitação e no dia seguinte 1 hora a temperatura ambiente.

Após a incubação com o anticorpo primário lavou-se a membrana 3 vezes com PBST, cada lavagem teve a duração de 5 minutos. Após as lavagens foi adicionado o Ab secundário, anti-soro de coelho (Sigma) na diluição 1:4000, acoplado a fosfatase alcalina permanecendo em incubação durante 2 horas à temperatura ambiente, com agitação. A membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBST, cada lavagem teve a duração de 5 minutos.

No caso particular da amostra ser originária de uma planta *Medicago* geneticamente transformada incubou-se previamente o anticorpo primário com um extracto de *M. truncatula* selvagem para reduzir ligações não específicas.

Para a detecção foi usada uma solução contendo 2 ml de tampão NBT/BCIP (0,1M Tris-HCl pH 9,0; 0,01M NaCl; 0,05 MgCl₂), 13,2 µl de NBT (Promega) e 6,6 µl de BCIP (promega). A detecção colorimétrica resulta da acção da enzima fosfatase alcalina que cataliza a conversão do substrato num precipitado sobre a membrana. Colocou-se a membrana em cima de um vidro e espalhou-se a mistura na membrana. Devido à reacção ser sensível à luz, a membrana

permaneceu às escuras até que fossem visíveis bandas. A reacção foi parada com água desionizada e a membrana ficou a secar à temperatura ambiente.

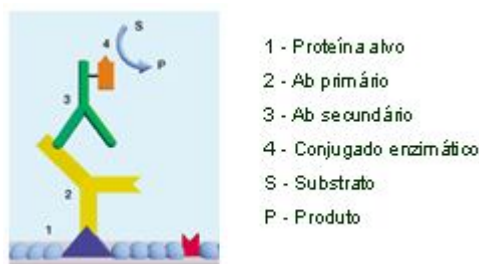


Figura 6: Esquema representativo da imunodeteção colorimétrica, usando um Ab conjugado, Biorad

2.7 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford

O ensaio de proteínas Bradford (Bio-Rad) foi usado para determinar a concentração de proteínas. Albumina de soro de bovino (BSA) foi usada para definir curvas de calibração para determinação quantitativa de proteínas.

Prepararam-se 6 diluições em *ependorfs* a partir da solução-stock de BSA (concentração 100 µg/ml) obtendo-se quantidades diferentes e conhecidas de proteína padrão (entre 1,2 e 20 µl/ml), de forma a traçar uma curva de calibração (ver figura 26 em anexos). O volume final de cada diluição foi 800 µl. Para o branco procedeu-se da mesma forma, mas neste caso o volume padrão de proteínas foi substituído por água. As amostras foram preparadas de forma semelhante. O volume que se adicionou de amostra tinha concentração desconhecida que foi posteriormente determinada usando a curva padrão. A cada uma das amostras, padrões ou branco adicionou-se 200 µl do corante concentrado (BioRad Dye Reagent Concentrate) perfazendo assim um volume final de 1 ml em cada tubo e misturou-se com o auxílio do vórtex. Incubou-se à temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos e mediram-se as absorvâncias contra o branco a 595 nm num espectrofotómetro (Beckman, modelo DU-70).

2.8 Concentração da amostra

Nos casos em que as amostras se encontravam muito diluídas foram usados dispositivos de ultrafiltração e posteriormente precipitação com etanol para concentrar. Caso contrário concentrou-se somente por precipitação com etanol.

2.8.1 Dispositivos de ultrafiltração Centricon

Adicionou-se a amostra no dispositivo de ultrafiltração (limite da membrana 10 kDa) Centricon (Millipore), volume máximo de 2 ml e fechou-se. Centrifugou-se a 3000 x g (Heraeus, Sepatech) durante 1 hora e 25 minutos, a 5°C. Depois de concentrar, removeu-se o Centricon da centrífuga, separou-se a parte da amostra do frasco do filtrado e recolheu-se o filtrado.

2.8.2 Dispositivos de ultrafiltração Amicon

Adicionou-se a amostra no dispositivo de ultrafiltração (limite da membrana 10 kDa) Amicon (Millipore), volume máximo de 4 ml e fechou-se. Centrifugou-se durante 15 minutos a 3270 x g num rotor oscilante (centrífuga Allegra® X-12R). Para recuperar o soluto concentrado, inseriu-se uma pipeta no topo da unidade do filtro e recolheu-se a amostra. A amostra concentrada foi removida imediatamente depois da centrifugação para obter uma melhor recuperação.

2.8.3 Precipitação com etanol absoluto

As proteínas solúveis totais (TSP) dos meios de cultura das suspensões transgênicas e *wild-type* foram concentradas por precipitação com etanol absoluto frio (-20°C) durante pelo menos duas horas a -20°C. De seguida centrifugou-se a 10000 x g durante 10 minutos. O *pellet* depois de seco sob vácuo, foi ressuscitado em tampão de amostra 1x concentrado. Antes de serem aplicadas no gel, as proteínas foram desnaturadas por aquecimento a 100°C durante 10 minutos. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE num gel de poliacrilamida 12% usando um Mini-protean 3 (Bio-Rad). Após electroforese, Azul de Coomassie ou nitrato de prata foram usados para fixar proteínas (o protocolo de coloração com prata encontra-se em anexo).

2.9 Estabelecimento de culturas de células vegetais em suspensão

Foram estabelecidas culturas de células em suspensão das linhas transgênicas de *Arabidopsis* seleccionadas. Para indução de *callus*, foram usadas folhas previamente esterilizadas 3 minutos em lixívia 0,05% (v/v) e Tween 20 0,0012% (v/v), lavadas duas vezes em água destilada estéril (8 minutos cada lavagem), seguidas por 3 minutos de incubação em etanol 70% (v/v) e lavadas mais duas vezes em água destilada estéril. Após a esterilização, as folhas foram colocadas em contacto com o meio (Murashige & Skoog, MS) suplementado com sacarose (30g/l), cinetina (1 mg/l), 2,4-D (1 mg/l), DTT (10 mg/l), pH ajustado a 5,8 e solidificado com Micro Agar (7g/l). Depois de 30 dias no escuro a 23°C, foi obtido *calli* que foi repicado para o mesmo meio. Quando se obteve *calli* suficiente, os agregados celulares foram dispersos em meio de cultura líquido MS suplementado com sacarose (30g/l), cinetina (0,05 mg/l), 2,4-D (0,5 mg/l) e pH 5,8 em

frascos *Erlenmeyer*. As culturas em suspensão foram mantidas com agitação (125 rpm) num agitador orbital (Innova 4900, New Brunswick Scientific, Nurtinger, Germany) no escuro, a 24°C. As células foram repicadas de forma empírica (duração máximo de 1 mês entre cada repicagem) para meio fresco com a mesma composição.

Estabeleceu-se também uma cultura de células de *Medicago* expressando EPO na forma retida a partir de *callus* induzido de folhas de planta *Medicago* transgénica. O *callus* foi disperso em meio de cultura líquido MS suplementado com sacarose (30 g/l), 2,4-D (1 mg/l), cinetina (1 mg/l) e pH ajustado a 5,8. As plantas *Medicago* são mantidas em cultura *in vitro* e propagadas em meio MS, sem reguladores de crescimento, suplementado com 30 g/l de sacarose, 7 g/l de microagar e pH ajustado a 5,85, numa câmara de crescimento (PHYTOTRON EDPA 700, ARALAB) com 16 horas de fotoperíodo sob a forma de luz branca fluorescente e com uma temperatura de 24°C com luz e de 22°C às escuras.

Cada litro de cultura preparou-se a partir de soluções-*stock* de reguladores de crescimento e de meio MS previamente preparadas e armazenadas. O açúcar foi pesado e adicionado directamente. A solução-*stock* das hormonas cinetina e 2,4-D foi preparada adicionando individualmente 10 mg de cada hormona a 10 ml de H₂O destilada (1 mg/ml). As hormonas são insolúveis em água, por isso foram dissolvidas em ácido, base ou álcool. O meio MS é disponibilizado comercialmente como um pó que é altamente higroscópico. Preparou-se um tubo com 50 ml da solução *stock* concentrada vinte vezes para o meio MS por cada litro de meio. Todo o procedimento foi realizado em condições de esterilidade. Os meios de cultura foram autoclavados, já que todos os seus componentes são termoestáveis.

2.10 Taxa de crescimento de culturas de células vegetais

Foi estabelecida uma cultura de células em suspensão de *Arabidopsis* WT de modo idêntico ao estabelecimento de culturas de células de *Arabidopsis* transgénica (secção 2.9).

2.10.1 Curvas de crescimento

A cinética de crescimento de uma linha celular de *Arabidopsis thaliana* transgénica foi determinada através da medição do peso fresco e do peso seco. O inóculo inicial foi colocado em frascos *Erlenmeyer* de 250 ml que continham 20 ml de meio fresco, e mantidos a 24°C no escuro, num agitador orbital (Innova 4900, New Brunswick Scientific, Nurtinger, Germany) a 125 rpm. Dois frascos de cultura foram tomados aleatoriamente a determinados intervalos durante

um período de 35 dias. As células foram recolhidas por filtração por vácuo usando um papel de filtro pré-pesado (Whatman nº1). O peso fresco foi determinado pela subtração do correspondente peso ao papel de filtro. As amostras foram secas em estufa (WTB binder) a 70 °C durante pelo menos 48 horas. Depois do papel de filtro estar bem seco voltou-se a pesar, subtraindo-se o valor obtido ao peso do papel de filtro para determinação do peso seco.

2.11 Purificação de EPO

Quando a proteína se encontrava no sobrenadante da cultura, as células foram removidas por filtração por vácuo ou por centrifugação antes de iniciar os passos de purificação.

No caso em que a proteína não era secretada para o meio de cultura, foi necessário realizar a disrupção celular. Filtraram-se as células com vácuo e pesaram-se. Arrefeceu-se um almofariz com azoto líquido, onde foram colocadas as células. De seguida, as células foram congeladas com azoto líquido e maceradas até ficarem em pó. Juntou-se tampão de extração (NaCl 100 mM, ácido ascórbico 10 mM e β -Mercaptoetanol 5 mM) numa relação de 1 g de células por 2 ml de tampão. Esperou-se que ficasse líquido (descongelado) e colocou-se em tubos de centrifuga. Centrifugou-se a 18000 \times g ou 15 000 rpm (Heraeus), 20 min, 4°C. Retirou-se o sobrenadante para tubos novos e centrifugou-se novamente 10 min nas mesmas condições.

Para confirmar a presença da cauda de histidinas na proteína realizou-se um *Western blotting* como descrito na secção 2.7, diferindo apenas nos anticorpos usados. O anticorpo monoclonal anti-histidina (Novagen) na diluição 1:1000 foi o anticorpo primário usado e anti-rato, na diluição 1:4000 (Sigma) acoplado a fosfatase alcalina foi usado como anticorpo secundário.

2.11.1 Purificação de afinidade a metais imobilizados

A fusão da proteína recombinante a uma cauda de poli-histidinas conferiu a possibilidade de usar cromatografia de afinidade a metais imobilizados (IMAC). A purificação da eritropoietina recombinante foi realizada com uma resina Ni-NTA (Qiagen). Em primeiro lugar foi necessário equilibrar a resina com tampão de equilíbrio PBS (1x) pH 7,5, para tal adicionou-se este tampão a 200 μ l de resina, centrifugou-se repetidamente e descartou-se o sobrenadante. O pH da amostra foi ajustado a 7, adicionou-se a resina equilibrada e deixou-se a incubar 2 horas à temperatura ambiente com pouca agitação. Em seguida, aplicou-se a amostra na coluna e recolheu-se a fracção não ligada, *flow-through*. Após a ligação da proteína a resina foi lavada com PBS (1x) pH 7,5. As proteínas ligadas foram eluídas usando tampão de eluição acetato de

sódio 0,05 M NaCl 0,5 M imidazole 400 mM, pH 5. Todos os passos foram feitos a temperatura ambiente e as fracções foram armazenadas a -20°C.

2.11.2 Cromatografia de troca iónica

DEAE-Sepharose e SP-Sepharose foram adquiridas de Pharmacia Biotech AB Uppsala, Suécia. As colunas de cromatografia (0,8 x 4 cm) foram adquiridas da Bio-Rad.

Todas as amostras foram aplicadas a colunas após a resina ter sido equilibrada. Para equilibrar a resina centrifugou-se o volume desejado de resina durante 1 minuto a 10000 x g. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se a resina em tampão de equilíbrio. De seguida agitou-se e voltou-se a centrifugar durante 1 minuto a 10000 x g. Este passo foi repetido 3 vezes. A resina foi ressuspensa em tampão de equilíbrio e adicionada ao meio de cultura diluído com tampão de equilíbrio concentrado (1/3 do volume da amostra) de forma a manter o pH desejado. A solução permaneceu em agitação a 4°C para permitir a ligação de proteínas à resina. A aplicação da amostra foi seguida por um passo de lavagem, para eluir as moléculas não ligadas, com 5-10 volumes da resina de tampão de equilíbrio.

Procedimentos cromatográficos tais como tampões e volumes para equilíbrio das colunas, lavagem e eluição variaram em cada passo. Por isso as condições específicas para cada operação são especificadas na secção dos “Resultados e discussão”.



2.12 Separação de proteínas com sulfato de amónio

A amostra foi submetida a precipitação com sulfato de amónio empregando cinco percentagens de saturação diferentes (20%, 40%, 60% e 80% de saturação) a fim de avaliar em qual destas ocorre a precipitação da EPO. A cada saturação com sulfato de amónio, a solução foi agitada por 10 minutos a 4°C, centrifugada a 18500 x g por 20 minutos a 4°C e colectado o sobrenadante. O sal foi removido do sobrenadante por ultrafiltração, através de lavagens sucessivas com tampão PBS (1X).

O cálculo de gramas de sulfato de amónio necessárias para atingir a percentagem de saturação de sal desejada na amostra foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{g de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{515 (X - X_0)}{100 - 0.27X} \quad (\text{para 1 litro de solução})$$

onde: X é a concentração final; X_0 é a concentração inicial

2.13 Análise das células por microscopia

As lâminas foram lavadas com detergente Decon 90 a 2% durante 2 horas sob agitação. Em seguida foram lavadas com água e colocadas em etanol a 70%. Por fim foram secas à temperatura ambiente.

Colocaram-se algumas gotas de meio de cultura sobre uma lâmina com o auxílio de uma micropipeta. Cobriu-se a preparação com a lamela e observou-se ao microscópio. As células foram observadas por microscopia de campo claro usando um microscópio invertido Leica DM IRB e as imagens foram guardadas com uma câmara digital Olympus DP11 acoplada.

Para testar a viabilidade das células foi usado o corante iodeto de propídio na concentração de 10 µg/ml. Para caracterizar as estruturas subcelulares foram usados os corantes laranja acridina na concentração de 70 µM e o vermelho neutro na concentração de 5 µg/ml. Colocaram-se algumas gotas de meio de cultura sobre uma lâmina e 2/3 gotas de corante. Cobriu-se a preparação com a lamela e observou-se usando microscopia de fluorescência. As imagens foram posteriormente melhoradas (contraste, luminosidade, etc) utilizando o programa Adobe Photoshop 7.

3. Resultados e discussão

3.1 Estabelecimento de culturas de células de *Arabidopsis* em suspensão

3.1.1 Selecção das plantas de *Arabidopsis* com maior nível de expressão de EPO

Inicialmente foi realizado um *screening* de plantas transgênicas de 3ª geração de *Arabidopsis thaliana* expressando eritropoietina (EPO). O objectivo deste *screening* foi confirmar que as linhas produziam EPO, pois já tinha sido anteriormente confirmado que o transgene estava presente utilizando a técnica de PCR.

Para a forma secretada foi realizado um *dot-blot* para verificar quais as mais altas expressoras, como descrito em materiais e métodos na secção 2.2.1, e foram seleccionadas as linhas 1, 8 e 12 (ver figura 7).



Figura 7: *Dot-blot* de extracto de folhas de *Arabidopsis* transgênica expressando EPO na forma secretada (as linhas seleccionadas estão assinaladas com *)

Para as três linhas seleccionadas, procedeu-se então à preparação do extracto proteico, obtido a partir das folhas das plantas, que foi aplicado em dois géis SDS-PAGE que correram simultaneamente; um foi corado com azul de coomassie e o outro gel foi usado para *Western blotting*. O resultado pode ser observado nas figuras 8 e 9 (A-coomassie blue e B-a respectiva membrana)

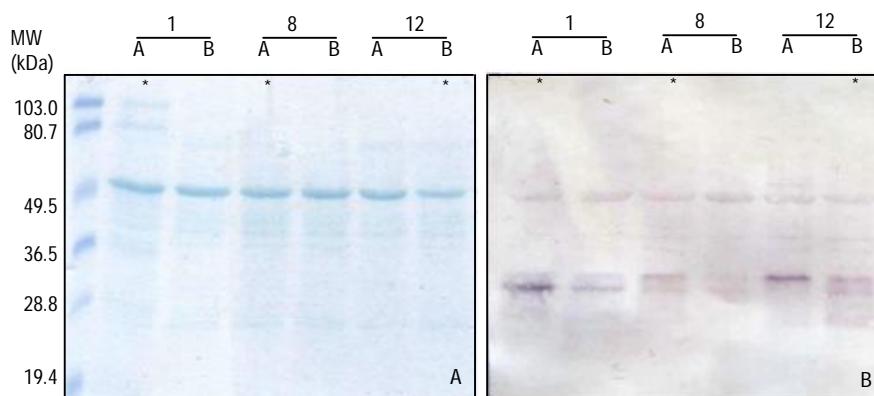


Figura 8: SDS-PAGE (A) e *Western blotting* (B) de extracto de folhas de *Arabidopsis* transgénica expressando EPO na forma secretada (As linhas melhores expressoras selecionadas para o trabalho estão assinaladas com *)

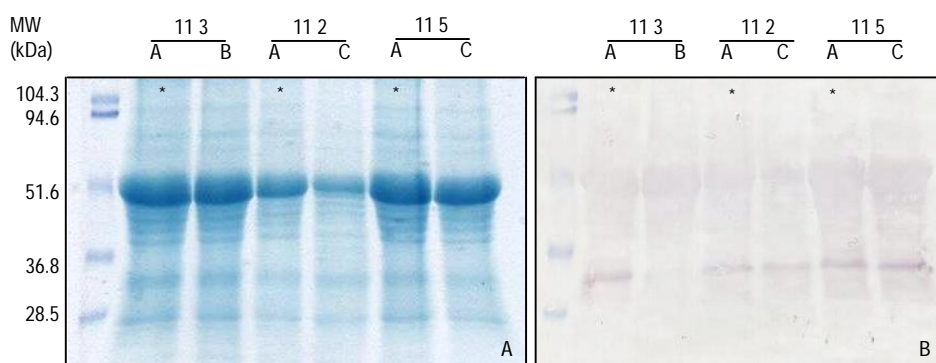


Figura 9: SDS-PAGE (A) e *Western blotting* (B) de extracto de folhas de *Arabidopsis* transgénica expressando EPO na forma retida (As linhas melhores expressoras selecionadas para o trabalho estão assinaladas com *)

Por análise dos resultados obtidos no *Western blotting* nas figuras 8B e 9B, confirmou-se a presença de EPO nas 3 linhas com maior nível de expressão de cada uma das formas. Estas linhas apresentam maior intensidade da banda com a massa molecular esperada para a EPO (cerca de 34 kDa) e foram designadas por 1A, 8A e 12B para a forma secretada e 11.2A, 11.3A e 11.5A para a forma retida. A banda com massa molecular de cerca de 50 kDa possivelmente corresponde à enzima que existe em maior concentração nas folhas verdes, a RuBisCO e que funciona como controlo interno, permitindo verificar se houve uma utilização de quantidades semelhantes de extracto proteico.

3.1.2 Estabelecimento das culturas de células em suspensão

Em seguida foi induzido *callus* a partir de folhas das linhas selecionadas e foram estabelecidas as culturas de células em suspensão, como explicado na secção 2.9.

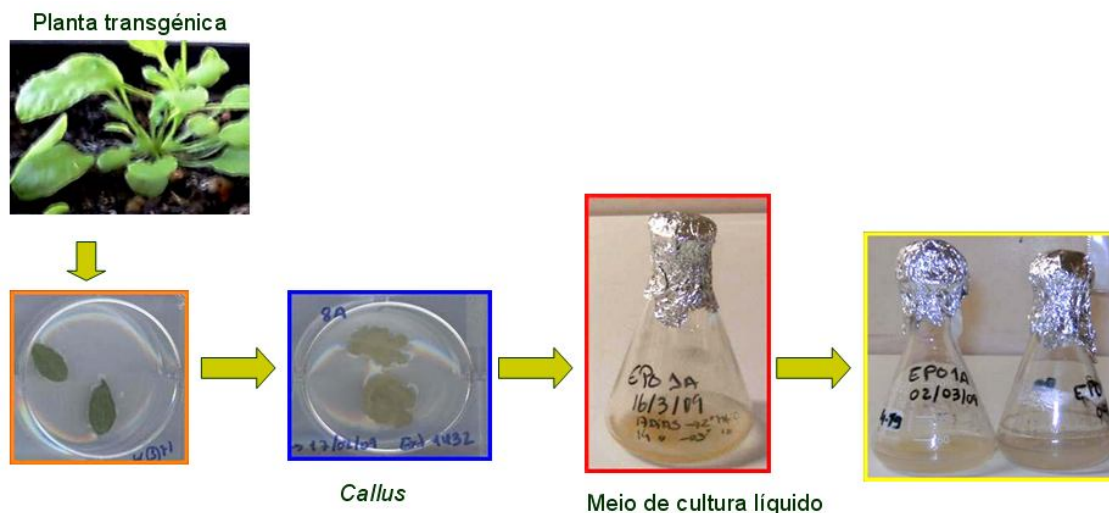


Figura 10: Esquema do estabelecimento de uma cultura de células em suspensão a partir de *calli*

3.1.3 Avaliação do nível de expressão de proteína

3.1.3.1 Avaliação do nível de expressão de proteína secretada no meio de cultura

Estabelecidas as culturas, o passo seguinte consistiu em confirmar se a proteína estava a ser produzida e secretada para o meio de cultura e avaliar o seu nível de expressão. Para tal, as proteínas existentes no meio de cultura da linha 1A ao fim de 17 dias foram separadas por SDS-PAGE seguido de *Western blotting* (figura 11). Usou-se um volume inicial de 7,3 ml de meio da linha 1A decantado, o qual foi concentrado 182,5X por ultrafiltração (limite da membrana 10 kDa) e por precipitação com etanol. O precipitado resultante foi aplicado em dois géis SDS-PAGE. Um dos géis foi corado com azul de coomassie e o outro foi usado para fazer a transferência das proteínas separadas por SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose como descrito em materiais e métodos, na secção 2.5.

A proteína foi visualizada por imunodeteção, sendo detectada a banda esperada para a EPO, embora ténue (figura 11B). Esta cultura ainda é muito jovem, no entanto espera-se que ao tornar-se mais estável e homogénea, com os parâmetros favoráveis ao seu crescimento, a quantidade de proteína no meio de cultura seja superior.

Para se proceder à identificação da proteína por espectrometria de massa será necessário otimizar a purificação da EPO que será abordada no capítulo seguinte.

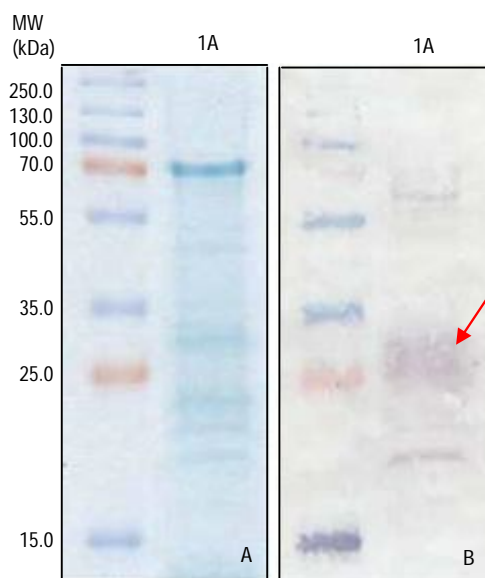


Figura 11: SDS-PAGE (A) e Western blotting (B) de meio de cultura da linha 1A de *Arabidopsis* com 17 dias. Foi usado um volume inicial de 7,3 ml de meio da linha 1A, o qual foi concentrado 182,5X

3.1.4 Comparação dos níveis de expressão de EPO das diferentes linhas celulares de *Arabidopsis*

3.1.4.1 Determinação da concentração de proteína total nos meios de cultura das linhas celulares de *Arabidopsis* usando o método de Bradford

Com o objectivo de avaliar o nível de expressão de cada uma das três linhas celulares estabelecidas expressando EPO na forma secretada (1A, 8A e 12B) procedeu-se à quantificação total de proteína nos meios de cultura de cada linha celular usando o método de Bradford como descrito na secção 2.7. O inóculo e o grau de diluição usados para cada linha foram idênticos para permitir uma comparação mais válida.

Após a determinação de proteínas totais em cada meio de cultura das três diferentes linhas celulares, calculou-se o volume que teria de ser usado para obter a mesma quantidade de proteínas totais e deste modo possibilitar a avaliação do nível de expressão de EPO relativamente às proteínas totais. A linha 1A foi a que apresentou maior quantidade de proteínas totais, enquanto que para as linhas 8A e 12B foi verificada uma concentração de proteínas totais muito inferior, sendo a 12B a menos concentrada. Estes resultados vieram apenas confirmar o que já se esperava por observação dos meios de cultura por visualização directa, uma vez que a

linha 12B apresentava aspecto muito transparente. Usaram-se volumes iniciais de 507 µl de meio 1A, 1047 µl de meio 8A e 16 ml de meio 12B que foram concentrados e aplicados a dois géis SDS-PAGE. Um dos géis foi corado com azul de coomassie e o outro foi usado para fazer a transferência de proteínas para uma membrana.

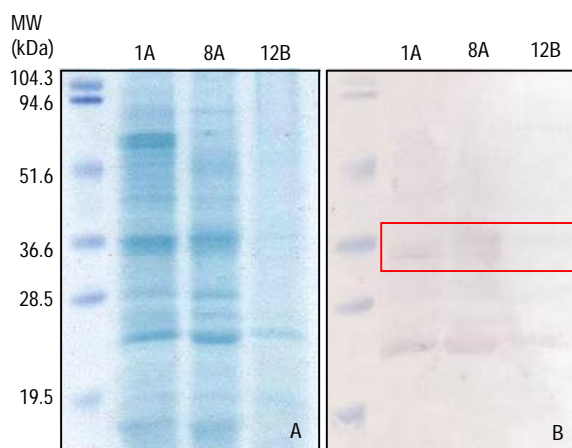


Figura 12: SDS-PAGE (A) e *Western blotting* (B) dos meios de cultura das linhas celulares 1A, 8A e 12B de *Arabidopsis*. Foram concentrados 507 µl de meio 1A, 1047 µl de meio 8A e 16 ml de meio 12B usando amicon (Millipore) e por precipitação com etanol, e aplicados a dois géis SDS-PAGE. Um dos géis foi corado com azul de coomassie e o outro usado para fazer a transferência de proteínas para uma membrana

Observando o gel corado com coomassie na figura 12A pode verificar-se que embora as linhas tenham sido estabelecidas a partir da mesma espécie (*Arabidopsis thaliana*), estas demonstram algumas diferenças no padrão de proteínas. O resultado do *Western blotting* apresenta algumas ligações inespecíficas, mas as bandas expectáveis para a EPO podem ser visualizadas na figura 12B.

A partir deste momento, as linhas celulares selecionadas para realizar estudos foram a 1A e a 8A. A linha 1A foi a primeira cultura a ser estabelecida, o que contribuiu para que fosse a mais utilizada na realização de pesquisas devido à sua disponibilidade. A linha 8A também se mostrou favorável, optando-se por usar esta linha, aquando da indisponibilidade da linha celular 1A.

3.1.4.2 Avaliação do nível de expressão da proteína retida no Retículo Endoplasmático

O estabelecimento das culturas de células em suspensão expressando EPO na forma retida foi posterior às da forma secretada, uma vez que as sementes disponíveis no início deste projecto eram da segunda geração, tendo sido necessário esperar pela terceira geração, o que atrasou a

obtenção de *callus* e consequentemente a oportunidade de realização de mais estudos com estas linhas celulares.

Após 15 dias do estabelecimento da linha celular 11.3A, as células foram usadas para extracção proteica como descrito na secção 2.11. O extracto proteico foi usado para SDS-PAGE seguido de *Western blotting* para confirmar e avaliar o nível de expressão da proteína retida de forma semelhante ao que tinha sido realizado anteriormente com a linha celular expressando EPO na forma secretada. O volume total carregado em cada poço dos géis foi 30 μ l (21 μ l de amostra e 7 μ l de tampão 4X).

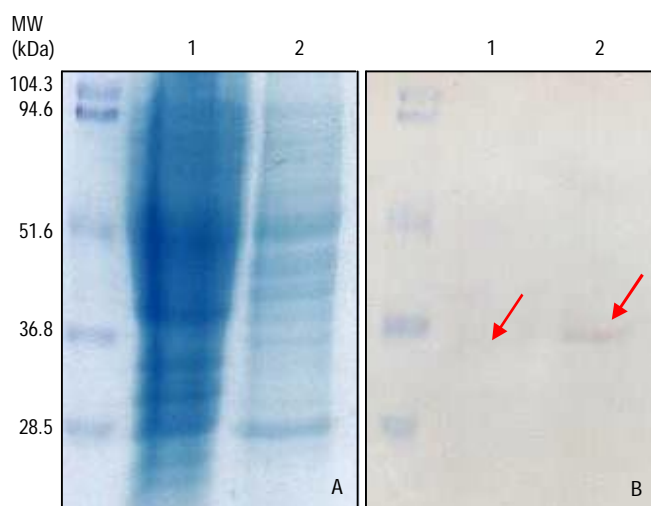


Figura 13: SDS-PAGE (A) e *Western blotting* (B) de extracto celular da linha celular de *Medicago truncatula* expressando EPO na forma secretada como controlo positivo (linha 1) e de extracto celular da linha 11.3A de *Arabidopsis* expressando EPO na forma retida (linha 2)

Na figura 13B está representado o resultado do *Western blotting* correspondente ao gel da figura 13A. Na linha 2 (amostra do extracto de células de *Arabidopsis*) é visível uma banda correspondendo a uma proteína com cerca de 34 kDa que é a massa molecular esperada para a EPO e que apresentou afinidade para o anticorpo anti-EPO. Esta banda revela uma massa molecular superior à da linha 1 (amostra de extracto das células de *Medicago* usada como controlo positivo). A massa molecular superior da EPO na forma retida (com KDEL) produzida em *Arabidopsis* comparativamente à EPO na forma sem KDEL produzida em *Medicago*, pode ser um indício de que a EPO está a ser direccionada a vias não esperadas (a distribuição celular de proteínas foi recentemente estudada por González-Melendi *et al.*, 2009). Uma possibilidade

poderá ser o direccionamento da proteína ao vacúolo, tornando-se numa proteína com uma massa molecular mais baixa, em que os N-glicanos são do tipo paucimanosídicos. Outra hipótese para esta diferença poderá dever-se a factores específicos de espécie que podem diferir nos seus mecanismos de glicosilação de proteínas. A EPO apresenta três potenciais sítios de N-glicosilação, o que não significa que estes sítios de ligação sejam preenchidos ou que o sejam de forma idêntica nas duas espécies.

O facto de ter sido apenas detectada uma banda na linha 2 parece apontar para uma maior homogeneidade na produção de EPO na forma retida, com apenas uma isoforma, revelando-se a este nível mais vantajosa do que a forma secretada, que apresenta heterogeneidade de isoformas, sendo que a heterogeneidade é uma das críticas apontadas ao uso de culturas de células em suspensão na produção de proteínas heterólogas com aplicações terapêuticas.

A retenção da EPO no R.E. poderá ser mais favorável à acumulação de proteína recombinante relativamente à forma secretada da proteína no que respeita a níveis de expressão, pois a proteína recombinante ao ser secretada para o meio de cultura pode tornar-se instável e ser degradada por proteases.

Inicialmente esperava-se que a secreção da proteína tornasse o processo de purificação mais fácil, sem a necessidade do processo de extracção das células que implica mais custos e que pode ser severo para a proteína, pode influenciar a sua actividade biológica ou a sua estrutura conformacional. No entanto, como será descrito na secção da purificação, a secreção para o meio de cultura também apresenta algumas dificuldades na recuperação e isolamento do produto.

3.2 Purificação parcial de EPO

3.2.1 Purificação parcial de EPO do meio de cultura celular da espécie *Medicago truncatula*

Foram desenvolvidos métodos de purificação de proteínas que foram experimentados em primeiro lugar em culturas de células de *Medicago* antes de prosseguir com a purificação de EPO nas culturas de *Arabidopsis*.

3.2.1.1 Cromatografia de troca iónica: SP-Sepharose como passo de purificação inicial

Geralmente a purificação de proteínas envolve uma série de etapas que tem em vista o isolamento da proteína desejada de uma mistura complexa de proteínas e de outros componentes.

Antes de iniciar um protocolo de purificação deve-se avaliar quais as estratégias a seguir, tendo em conta a utilização prevista da proteína, o material que está disponível no início e como deve ser manipulado, quais as impurezas que têm de ser removidas e qual a formulação do meio. É importante considerar qual a pureza, quantidade, manutenção da actividade biológica e economia em termos de dinheiro e tempo que depende do uso previsto do produto final. O objectivo é minimizar o número de passos utilizados na purificação, de forma a não perder muita quantidade de proteína purificada e maximizar o rendimento final.

Os passos de separação exploram as diferenças no tamanho da proteína, as propriedades físico-químicas e a afinidade de ligação.

A cromatografia de troca iónica baseia-se na ligação das proteínas aos trocadores iónicos através de forças electrostáticas entre as cargas da superfície das proteínas (estas variam de acordo com o pH circundante) e os grupos carregados dos trocadores. A fase estacionária é um adsorvente, uma resina com carga positiva ou negativa, à qual se ligam, por interacção iónica, as proteínas a separar da mistura.

Estas proteínas são posteriormente eluídas por um electrólito de carga diferente da carga da resina e de carga igual à dos componentes da mistura (neste trabalho foi usado o sal NaCl). Estes são mais ou menos retardados durante a eluição em função da afinidade para a resina. Esta técnica separa, assim, as proteínas com base na sua carga global.

A cromatografia de troca catiónica foi experimentada como passo de purificação inicial de EPO presente no meio de cultura de Medicago.

A presença de ácido siálico nas extremidades das cadeias de oligossacáridos confere carga negativa à EPO, que apresenta ponto isoeléctrico entre 2,8 e 4,5. A EPO produzida em plantas não tem ácido siálico e o seu ponto isoeléctrico é aproximadamente 8,5 (Imai *et al.*, 1990) o que pode representar uma vantagem no passo de purificação por cromatografia de troca catiónica, uma vez que são poucas as proteínas que têm um ponto isoeléctrico tão elevado. Assim sendo, quando a EPO está a um pH acima do seu ponto isoeléctrico, a proteína liga-se a uma resina de troca aniónica e quando está abaixo do seu ponto isoeléctrico liga-se a uma resina de troca catiónica.

Procedeu-se então à purificação em *batch* da proteína recombinante usando uma resina de troca catiónica. O meio de cultura de *Medicago truncatula* contendo a EPO foi diluído com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5 (meio diluído; MD) de modo a acertar o valor do pH do meio para o desejado e permaneceu em agitação durante a noite com a resina SP Sepharose Fast Flow (SPFF), resina de troca catiónica, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5 para permitir a ligação da EPO. Posteriormente a resina SP Sepharose foi empacotada numa coluna e obteve-se a fracção que não ligou à resina (flow-through; FT). Após um passo de lavagem (washing; W), as proteínas que ligaram à resina foram eluídas diferencialmente, aumentando a concentração de sal. Usou-se uma solução de eluição NaCl 500 mM e depois NaCl 1000 mM. Os volumes finais de cada fracção foram: MD (133 ml); FT (133 ml); W (10 ml); E500 (2 ml) e E1000 (2ml). De meio não diluído (M) recuperaram-se 200 µl. Cada fracção, foi aplicada a SDS-PAGE 12% de acrilamida e um dos géis foi corado com azul de coomassie enquanto que o outro foi usado para *Western blotting*.

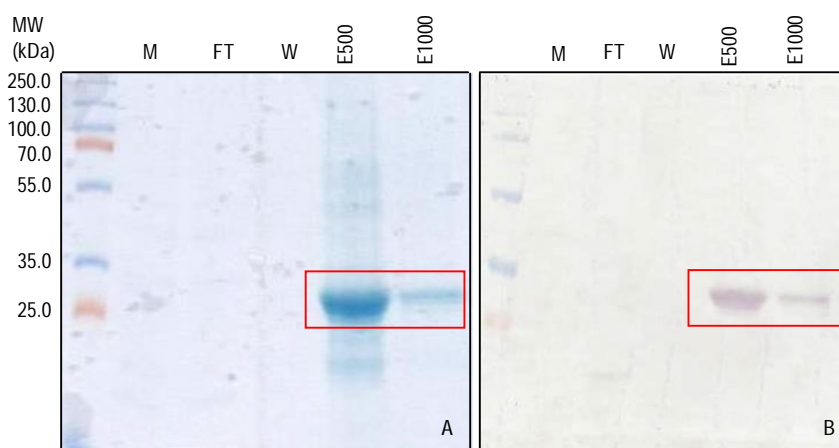


Figura 14: SDS-PAGE (A) e *Western blotting* (B) de fracções obtidas por cromatografia de troca catiónica de meio de cultura da linha celular de *Medicago* expressando EPO na forma secretada. Linha M: Amostra não diluída; Linha FT: Fracção que não ligou à resina; Linha W: Fracção obtida do passo de lavagem; Linha E500: Fracção eluída com NaCl 500 mM; Linha E1000: Fracção eluída com NaCl 1000 mM

A purificação parcial de EPO do meio de cultura da linha celular de *Medicago* foi atingida como se pode observar na figura 14. A EPO foi eluída entre 500 e 1000 mM de NaCl, obtendo-se uma banda forte aquando da eluição com NaCl 500 mM e outra banda mais fraca com NaCl 1000 mM. Para o meio de cultura, a fracção não ligada à resina e a de lavagem não foram visualizadas como bandas devido à sua elevada diluição.

Pretendendo-se otimizar a purificação foi aumentado o gradiente de eluição de NaCl (100 mM a 1000 mM) no tampão de eluição acetato de sódio 0,05 M pH 5 NaCl. Um volume de 110 ml de meio de cultura de *Medicago truncatula* contendo EPO foi diluído com tampão acetato de sódio 0,2 M até ajustar a pH 5 (meio diluído; MD) e permaneceu em agitação durante a noite com a resina SP Sepharose Fast Flow (SPFF) como descrito anteriormente. A resina SP Sepharose foi empacotada numa coluna e obteve-se a fracção que não ligou à resina (flow-through; FT). Após o passo de lavagem (washing; W) as proteínas que ligaram à resina foram eluídas diferencialmente. O gradiente crescente de eluição de NaCl usado, no tampão de eluição acetato de sódio 0,05 M pH 5 NaCl, foi 100 mM, 250 mM, 500 mM e 1000 mM. Os volumes finais de cada fracção foram: MD (120 ml); FT (120 ml); W (10 ml); E100 (2 ml); E250 (2 ml); E500 (2 ml) e E1000 (2ml). Cada fracção foi aplicada a SDS-PAGE 12% de acrilamida e um dos géis foi corado com azul de coomassie enquanto que o outro foi usado para *Western blotting*.

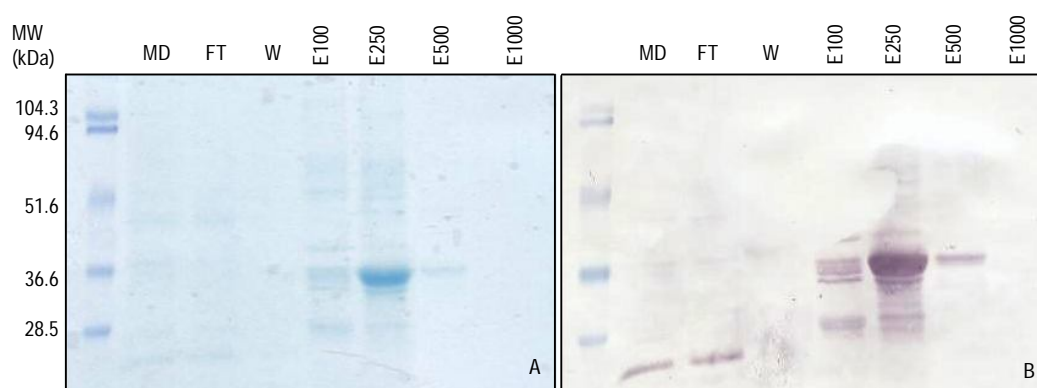


Figura 15: SDS-PAGE (A) e *Western blotting* (B) de fracções obtidas por cromatografia de troca catiónica. O meio de cultura de *Medicago truncatula* diluído com tampão acetato de sódio 0,2 M (meio diluído; MD) e pH 5 foi passado numa coluna SP Sepharose. Linha MD: Amostra diluída; Linha FT: Fracção não ligada à resina; Linha W: Fracção obtida do processo de lavagem; Linha E100: Fracção eluída com tampão de eluição acetato de sódio 0,05 M pH 5 NaCl 100 mM; Linha E250: Fracção eluída com tampão de eluição acetato de sódio 0,05 M pH 5 NaCl 250 mM; Linha E500: fracção eluída com tampão de eluição acetato de sódio 0,05 M pH 5 NaCl 500 mM; Linha E1000: Fracção eluída com tampão de eluição acetato de sódio 0,05 M pH 5 NaCl 1000 mM

Na figura 15 é possível observar que da eluição com tampão de eluição acetato de sódio 0,05 M pH 5 NaCl 250 mM obtém-se o maior rendimento de EPO, no entanto outras proteínas são eluídas também com esta concentração de sal. Dependendo do uso previsto para a proteína, seria escolhida a concentração de sal para eluição. Se fosse necessário obter uma grande quantidade de proteína, usava-se o tampão de eluição com NaCl 250 mM, mas se o objectivo fosse obter uma fracção de proteína muito pura, usava-se o tampão de eluição NaCl 500 mM.

Após a eluição com o tampão NaCl 500 mM, obtém-se apenas uma das isoformas da proteína, mas com maior nível de pureza que quando se usa tampão de eluição NaCl 250 mM. Caso fosse necessário determinar o perfil de eluição com maior precisão, a amostra poderia ser eluída com um gradiente linear de NaCl em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Neste tipo de cromatografia o eluente é contínuo e assim obtemos o valor exacto da concentração do tampão a que a proteína é eluída.

3.2.1.2 Cromatografia de afinidade

Após a optimização da cromatografia de troca catiónica, em que foi eliminada grande parte das proteínas contaminantes, usou-se cromatografia de afinidade com iões metálicos imobilizados (IMAC) para purificação de EPO que possui uma cauda de seis-histidinas (*His-tag*).

Duas fracções obtidas após eluição da resina SP-Sepharose que continham EPO (E250+500), obtidas do passo inicial de purificação (cromatografia de troca catiónica) foram passadas numa coluna de Ni-NTA (Quiagen) que contém o ião níquel imobilizado. A cauda de histidinas possui afinidade a iões metálicos e teoricamente deveria ligar à resina de Níquel por afinidade. Depois de passar a amostra várias vezes pela coluna, a fracção que ligou à resina foi eluída com tampão de eluição que continha uma ligando competitivo, o imidazole. O meio de cultura da linha MtPhy-AH de células de *Medicago truncatula* a produzirem fitase (Pires *et al.*, 2008) foi também aplicado aos géis para analisar a existência de ligações inespecíficas, pois a banda detectada com o peso aproximadamente esperado para a EPO nas figuras 14B e 15B poderia não corresponder na totalidade à proteína de interesse, mas também a ligações inespecíficas do anticorpo primário a outras proteínas que não a EPO. No entanto, embora a fitase tenha reagido com o anticorpo primário, a banda detectada no *Western blotting* não foi muito forte comparativamente à banda de fitase no gel corado com coomassie, o que confirmou que a banda detectada no *Western blotting* corresponde efectivamente a EPO e não a ligações inespecíficas.

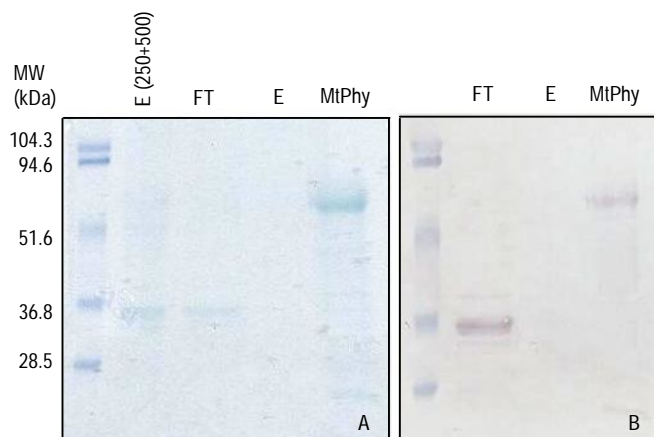


Figura 16: SDS-PAGE (A) e *Western blotting* (B) de fracções obtidas por cromatografia de afinidade de amostra resultante de duas fracções obtidas após passo de cromatografia de troca catiónica. E(250+500): Duas fracções de SP-Sepharose; FT: Fracção que não ligou à resina; E: Fracção eluída com imidazole; MiPhy: Meio de cultura da linha MiPhy-AH

O resultado obtido indica que a purificação pela cauda de histidinas não é eficiente, pois a proteína recombinante perdeu-se na totalidade no *flow-through*. O facto da proteína não ter ligado à resina pode dever-se à perda do *tag*, situação frequente quando a proteína sofre várias modificações pós-traducionais. Também existe a possibilidade de a conformação final que a proteína adquire não expôr o *tag* (embora a histidina seja um aminoácido hidrofílico e que teoricamente deveria ficar exposta à superfície), ficando encoberto por outras zonas da molécula. Se o resíduo de histidina não está disponível à superfície da proteína não se liga com o ião metálico e não fica retido na resina.

3.2.1.2.1 Confirmação da presença da cauda de histidinas

No sentido de verificar se o facto da EPO não ter ligado à resina se deve de facto à perda da cauda de histidinas, foram realizados dois *Western blotting* simultâneos, um usando o Ab-anti-rhEPO, e o outro usando o Ab anti-histidina para o extracto celular e para o meio de cultura da linha celular de *Medicago truncatula* expressando EPO na forma secretada. Os três géis, o que foi corado com azul de Coomassie e os outros dois que foram transferidos para as membranas de nitrocelulose, correram simultaneamente.

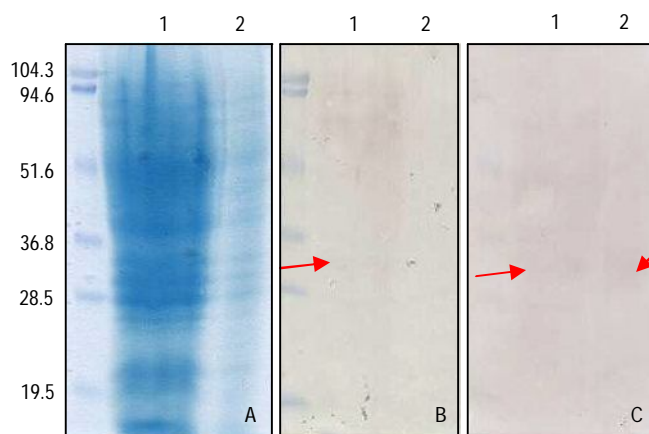


Figura 17: SDS-PAGE (A) e *Western blotting* com Ab anti-histidina (B) e com Ab anti-EPO (C) de extracto celular (linha 1) e de meio de cultura (linha 2) da linha celular de *Medicago truncatula* expressando EPO na forma secretada

Na figura 17 (C), que corresponde ao *Western blotting* com o Ab anti-EPO, é possível observar uma banda na linha 1 e uma banda na linha 2 com a massa molecular prevista para a EPO de cerca de 34 kDa. Na figura 17 (B) que corresponde ao *Western blotting* com Ab anti-histidina, a linha 1 (o extracto celular) apresentou uma banda (reacção com o Ab anti-histidina) com o peso aproximado da EPO, confirmando que a EPO possui a cauda de histidinas. O meio de cultura (linha 2) não apresentou nenhuma banda, mas este resultado negativo pode dever-se a um problema de diluição e não à perda da cauda de histidinas.

3.2.2 Purificação parcial de EPO do meio de cultura celular de *Arabidopsis thaliana*

Posteriormente à confirmação da presença da EPO no meio de cultura celular da linha 1A de *Arabidopsis*, procedeu-se à purificação da proteína recombinante a partir de *Arabidopsis*.

3.2.2.1 Cromatografia de troca iónica: SP-Sepharose como passo de purificação inicial

O meio de cultura da linha celular 1A de *Arabidopsis* com 14 dias (meio de cultura; M) foi aplicado a uma coluna SP Sepharose e obteve-se uma fracção não ligada (flow-through; FT). Após lavagem da coluna (washing; W) a fracção ligada foi eluída com tampão de eluição acetato de sódio 0,05 M pH 5 NaCl cuja concentração de sal foi aumentando: 100 mM, 250 mM, 500 mM e 1000 mM. Os volumes finais de cada fracção foram: FT (26 ml); W (10 ml); E100 (2 ml); E250 (2 ml); E500 (2ml); E1000 (2ml) e 26,6 ml de meio diluído. Cada fracção foi aplicada a dois géis, um em que as proteínas foram fixadas com nitrato de prata devido à elevada diluição do meio de cultura e o outro foi usado para transferência de proteínas para uma membrana.

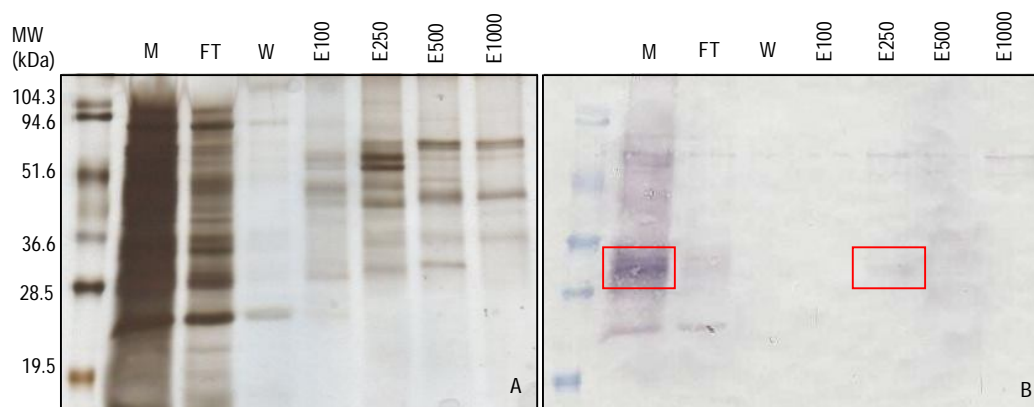


Figura 18: SDS-PAGE (A) e *Western blotting* (B) de fracções obtidas por cromatografia de troca catiónica do meio de cultura da linha celular 1A de *Arabidopsis*. M: Amostra não diluída; FT: Fracção que não ligou á resina; W: Fracção obtida do passo de lavagem; E100: Fracção eluída com tampão de eluição acetato de sódio 0,05 M pH 5 NaCl 100 mM; E250: Fracção eluída com tampão de eluição acetato de sódio 0,05 M pH 5 NaCl 250 mM; E500: Fracção eluída com tampão de eluição acetato de sódio 0,05 M pH 5 NaCl 500 mM; E1000: Fracção eluída com tampão de eluição acetato de sódio 0,05 M pH 5 NaCl 1000 mM

Na primeira linha da figura 18B, correspondente à amostra de meio de cultura da linha 1A de *Arabidopsis*, são visíveis duas bandas que possivelmente são as duas isoformas de EPO com diferentes perfis de glicosilação. Assim como ocorre em proteínas glicosiladas em geral, a EPO é encontrada como uma mistura de isoformas, relacionadas com a fracção variável de carboidratos presentes na proteína. Na linha E250 surge uma banda fraca, o que poderá sugerir que a proteína começa a ser eluída com tampão de eluição acetato de sódio 0,05 M pH 5 NaCl 250 mM. É provável que seja apenas possível purificar uma das isoformas de EPO, uma vez que estas possivelmente apresentam carga superficial diferente e por sua vez diferentes interacções electrostáticas com a resina de troca catiónica, sendo as condições de ligação e eluição diferentes. Ao purificarmos uma forma podemos estar a perder a outra ou as outras isoformas.

Optou-se por realizar cromatografia de troca catiónica para reter a proteína numa resina, porque a EPO tem um ponto isoelectrico tão elevado que ao aumentar o pH até conferir à proteína carga negativa, poderia ocorrer alteração das suas propriedades físico-químicas, da sua conformação, estrutura tridimensional e actividade biológica. A pH de aproximadamente 5 a proteína é estável e pode ligar-se a uma resina de troca catiónica.

Para além da cromatografia de troca catiónica outras estratégias foram investigadas para purificação de EPO. Uma delas consistiu em usar uma resina de troca aniónica em vez da resina de troca catiónica. O pH do meio de cultura de uma linha celular de *Arabidopsis* foi ajustado, tal como na cromatografia de troca catiónica, a pH inferior ao ponto isoelectrico da EPO. O pretendido ao usar esta estratégia era que a proteína não ligasse à resina e fosse recuperada na fracção não ligada (*flow-through*). No entanto optou-se por seguir antes a purificação de troca catiónica e na sua optimização.

A precipitação com sulfato de amónio também foi experimentada. O objectivo da precipitação com sulfato de amónio é encontrar a máxima percentagem de sal na presença da qual a proteína de interesse não precipita, sendo possível desta forma eliminar algumas das proteínas contaminantes, facilitando os subsequentes passos de purificação. No entanto esta estratégia não se mostrou indicada para a purificação da EPO, que está presente no meio de cultura a uma concentração muito baixa. Geralmente a precipitação de proteínas é usada para proteínas que existem em concentrações maiores.

3.3 Análise da cinética de crescimento da cultura de *Arabidopsis*

Uma cultura ideal entende-se por aquela que apresente um crescimento rápido, sem formação de muitos agregados celulares, para que o produto possa ser secretado para o meio e não tenha outras células aglomeradas a dificultarem a sua secreção eficiente. É ainda importante avaliar a cinética de crescimento de linha celular transgénica para determinar diferenças relativamente à cultura não transformada. Por estas razões foi gerada uma curva de crescimento ao longo de 35 dias.

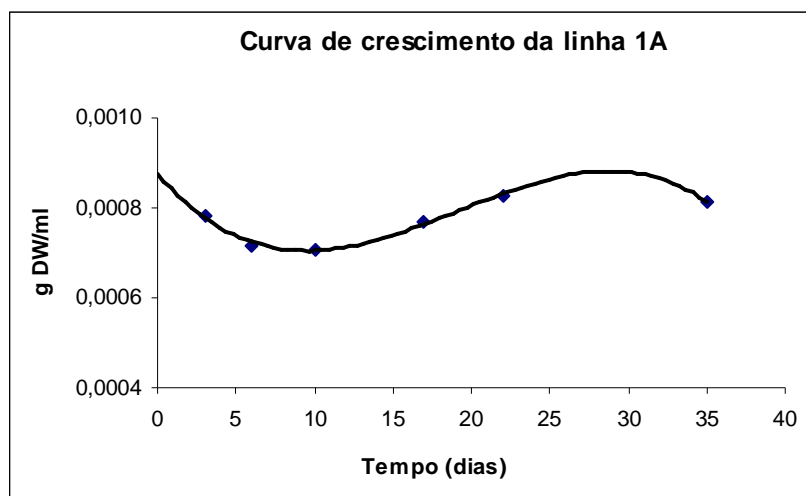


Figura 19: Cinética de crescimento de cultura de células em suspensão de *Arabidopsis* transgénica

Como observado na figura 19 o crescimento da linha celular foi muito baixo, atingindo a fase estacionária ao fim de aproximadamente 27 dias. Possivelmente a linha 1A não se adaptou ao novo meio de cultura líquido e o facto do inóculo usado para a geração da curva estar muito diluído poderá justificar a baixa taxa de crescimento verificada. Sendo a dinâmica do crescimento da linha celular um dos parâmetros importantes para a optimização da formação da EPO, aumentou-se a concentração de cinetina presente no meio de cultura para estimular a divisão celular, mas não foram observadas diferenças acentuadas no crescimento da linha celular.

3.4 Análise da morfologia e da viabilidade das células

A geração da curva de crescimento da linha celular 1A de *Arabidopsis* não foi conclusiva, mas induziu à observação citológica para analisar a morfologia e a viabilidade das células. O objectivo desta análise foi verificar se existiria alguma razão ao nível da morfologia que estivesse a dificultar a divisão e o crescimento das células, possibilitando uma melhor compreensão do comportamento das linhas celulares de modo a otimizar a produção de produto. As células de *Arabidopsis* foram ainda comparadas com duas linhas celulares de *Medicago*, uma estabelecida há mais tempo que produz fitase na forma secretada (Pires *et al.*, 2008) e a outra que produz EPO também na forma secretada (resultados não publicados). Foram observadas as diferenças entre culturas estabelecidas há mais tempo e culturas com menos tempo de estabelecimento intra-espécie e inter-espécie.

3.4.1 Análise da morfologia de células de *Medicago truncatula* e de *Arabidopsis thaliana*

3.4.1.1 Análise da morfologia de células de *Medicago truncatula*

Inicialmente foi recolhido meio de cultura contendo células de duas linhas celulares de *Medicago* com diferentes datas de estabelecimento. Não foi realizado qualquer pré-tratamento das amostras, procedendo-se rapidamente à observação das células usando microscopia óptica. Algumas das imagens obtidas encontram-se na figura 20. As células observadas demonstraram heterogeneidade de formas e frequentemente surgiram agrupadas em filamentos. As células destas linhas celulares apresentaram uma forma redonda ou alongada. As células por vezes encontravam-se agrupadas em cadeias lineares de 2 ou mais células, sendo as alongadas a formarem cadeias de maior comprimento.

No geral as células apresentaram dimensões muito grandes, principalmente as do meio de cultura da linha MtPhy-AH, que produzem fitase (Pires *et al.*, 2008), o que não era esperado

porque as células dividem-se rapidamente devido ao balanço de hormonas que não favorece o crescimento mas antes a divisão celular.

Sabendo que os vacúolos das células vegetais ocupam um volume significativo das células usou-se microscopia de fluorescência e os corantes vermelho neutro e o laranja acridina para avaliar a dimensão que o vacúolo toma relativamente à célula. O laranja acridina corou nitidamente o núcleo das células de *Medicago*, sendo possível também observar o vacúolo que não fica marcado, apresentando-se escuro. O vermelho neutro não se revelou tão eficiente quanto o laranja acridina.

Na figura 20C observa-se a morfologia do vacúolo das células de *Medicago*. O aumento do volume do vacúolo conduz ao alongamento das células. Este organelo ocupa quase a totalidade do volume da célula, enquanto que a quantidade de citoplasma é reduzida.

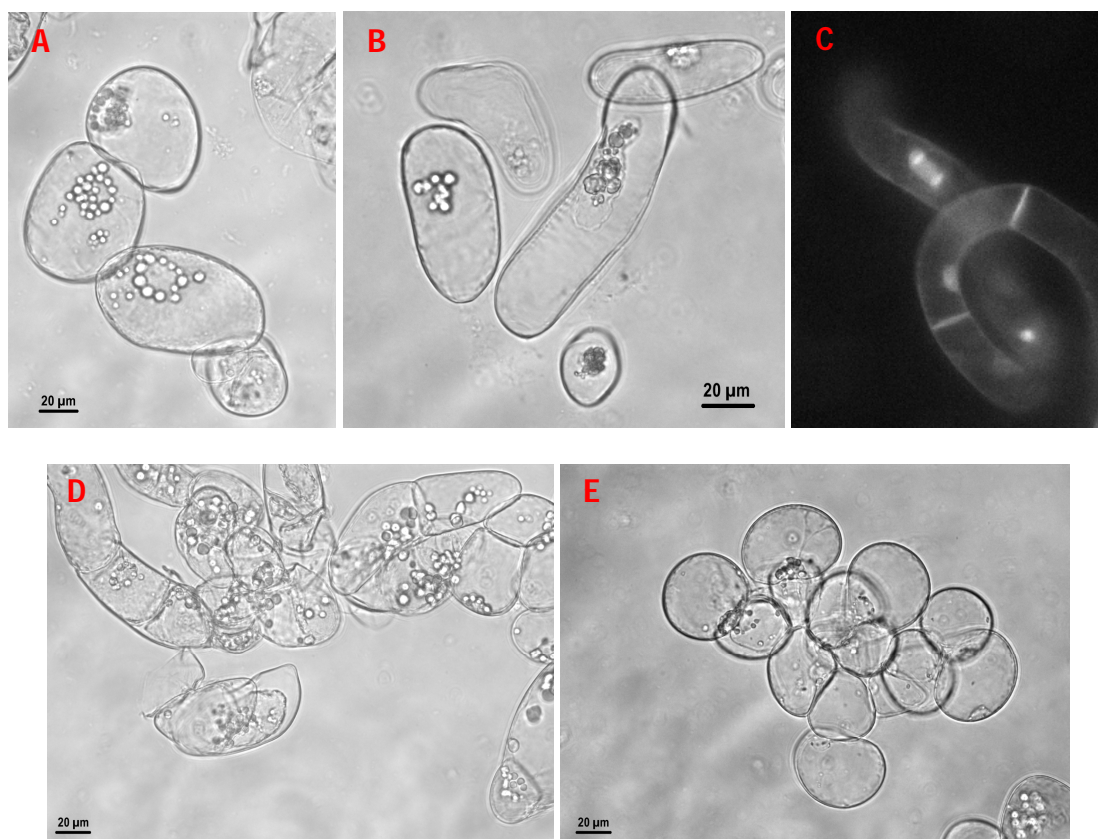


Figura 20: Morfologia de células em suspensão de *Medicago truncatula* expressando fitase na forma secretada (A, C, D e E) e expressando EPO na forma secretada (B). As imagens A, B, D e E foram obtidas por microscopia de luz visível. A imagem C foi obtida por microscopia de fluorescência, usando o corante laranja acridina

3.4.1.2. Análise da morfologia de células de *Arabidopsis thaliana*

Da observação das células de *Arabidopsis* verificou-se frequentemente a formação de aglomerados e poucas vezes células livres. As células mostraram-se nitidamente com dimensões menores que as células de *Medicago* e o vacúolo ocupando menos volume total da célula (figura 21C).

McCann *et al.* (1993) observaram que células de cenoura em proliferação rápida, quando colocadas em meio sem a auxina 2,4-D, a proliferação parava, resultando no alongamento das células. A divisão era desacoplada do alongamento celular. No entanto no presente trabalho observou-se que aquando do aumento de hormonas de crescimento (cinetina e 2,4-D) no meio de cultura das linhas celulares de *Arabidopsis*, aparentemente as células alongaram e as suas dimensões aumentaram.

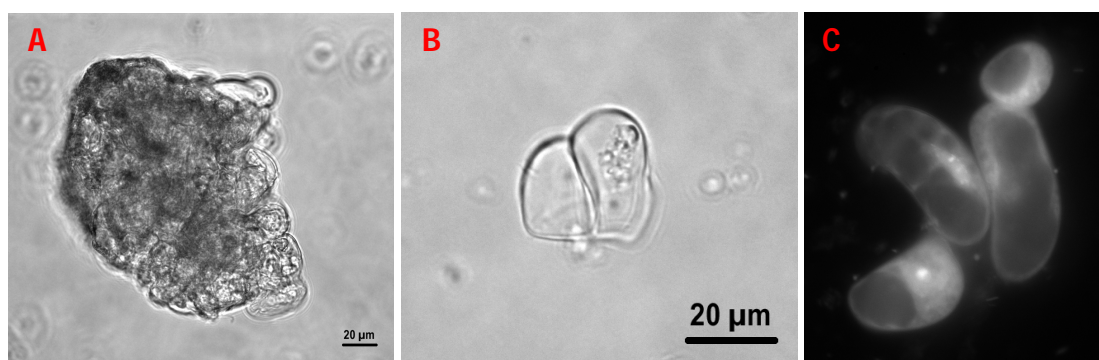


Figura 21: Morfologia de células em suspensão de *Arabidopsis* expressando EPO na forma secretada (A, B) e expressando EPO na forma retida (C). As imagens A e B foram obtidas por microscopia de luz visível. A imagem C foi obtida por microscopia de fluorescência, usando o corante laranja acridina

3.4.2 Análise da viabilidade das células de *Medicago* e de *Arabidopsis*

Com a finalidade de se determinar a viabilidade das células foi usado o corante iodeto de propídio que penetra apenas nas células mortas, enquanto que as células viáveis impedem a entrada do corante que permanece no meio de cultura ou acumula em redor das células. Nas células inviáveis o corante liga-se ao DNA no núcleo e fica com a cor fluorescente vermelha sob a luz ultravioleta.

Após a adição do corante iodeto de propídio aos diferentes meios de cultura de *Medicago* e *Arabidopsis*, as células foram observadas usando microscopia de luz visível e de fluorescência. A integridade e a viabilidade das células foi analisada por comparação das imagens obtidas das observações de campo claro e de fluorescência.

3.4.2.1 Análise da viabilidade das células de *Medicago truncatula*

No geral as células de *Medicago* apresentaram-se viáveis. O iodeto de propídio penetrou principalmente nos alomerados grandes de células, sugerindo que as células em aglomerados têm mais dificuldade em obterem os nutrientes, arejamento e outras condições imprescindíveis para se manterem viáveis. Nas figuras 22 e 23 observam-se células de duas linhas celulares de *Medicago* que se apresentam viáveis, sendo apenas visível fluorescência em redor das paredes celulares onde acumulou o corante. Já na figura 24, visualiza-se fluorescência no núcleo das células agrupadas em aglomerado, revelando-se inviáveis.

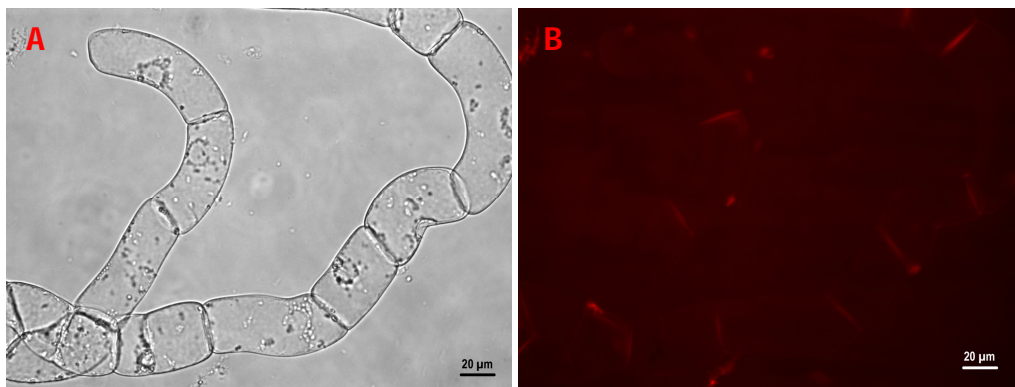


Figura 22: Análise da viabilidade de células em suspensão de *Medicago* expressando fitase na forma secretada. A imagem A foi obtida por microscopia de luz. A imagem B foi obtida por microscopia de fluorescência, usando o corante iodeto de propídio

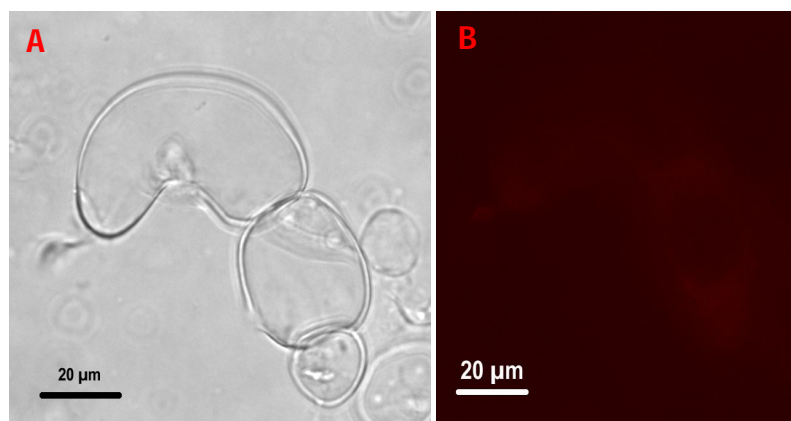


Figura 23: Análise da viabilidade de células em suspensão de *Medicago* expressando EPO na forma secretada. A imagem A foi obtida por microscopia de luz. A imagem B foi obtida por microscopia de fluorescência, usando o corante iodeto de propídio

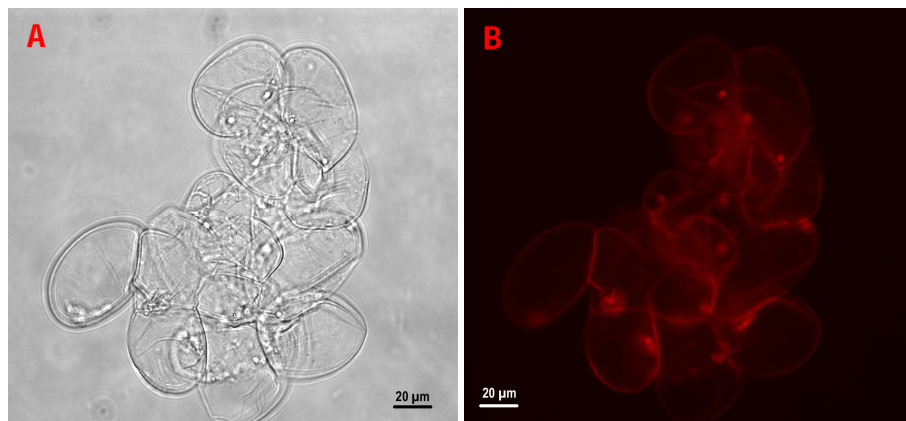


Figura 24: Análise da viabilidade de células em suspensão de *Medicago* expressando fitase na forma secretada. A imagem A foi obtida por microscopia de luz. A imagem B foi obtida por microscopia de fluorescência, usando o corante iodeto de propídio

3.4.2.2 Análise da viabilidade das células de *Arabidopsis thaliana*

A maior parte das culturas de células vegetais em suspensão são constituídas por agregados de maior ou menor dimensão, contrariamente às culturas microbianas que são constituídas por células individualizadas. Os padrões de agregação variam significativamente entre diferentes linhas celulares e também como consequência da idade da cultura e das condições de cultivo (Kieran *et al.*, 1997).

Da observação de meio de cultura de linhas celulares de *Arabidopsis*, foram na maioria das vezes visualizados muitos aglomerados compactos. Um exemplo pode ser observado na figura 25. O centro dos agregados apresentou-se mais escuro, enquanto que na periferia observaram-se algumas células viáveis. Os agregados apresentaram a tendência a dividirem-se e a afastarem-se e células isoladas raramente foram visualizadas.

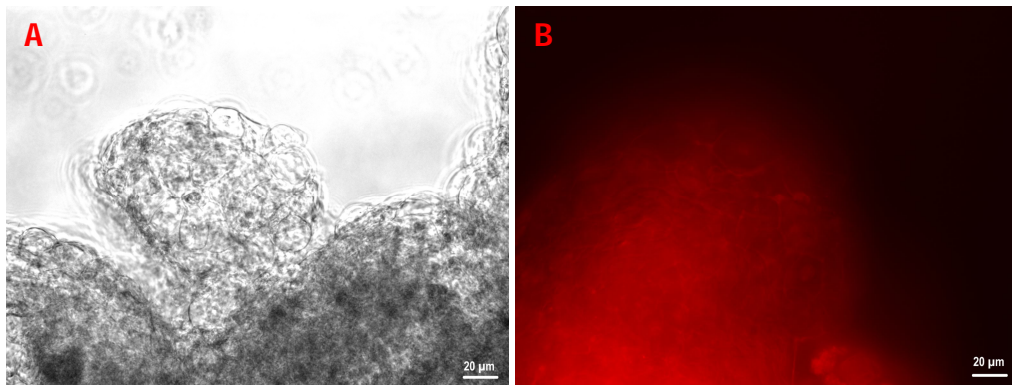


Figura 25: Análise da viabilidade de células em suspensão de *Arabidopsis* expressando EPO na forma secretada. A imagem A foi obtida por microscopia de luz. A imagem B foi obtida por microscopia de fluorescência, usando o corante iodeto de propídio

Nas linhas celulares de *Arabidopsis* observaram-se mais agregados do que nas linhas celulares de *Medicago*. O tecido de explante a partir do qual se estabelecem as culturas é um dos factores que influencia a homogeneidade de uma cultura. No entanto as culturas de ambas as espécies foram estabelecidas a partir de folhas. Esta diferença possivelmente deve-se ao facto das culturas de *Arabidopsis* terem menos tempo de estabelecimento e existir a necessidade de mais pesquisa na optimização das condições de cultivo de linhas celulares desta espécie.

4. Conclusões e perspectivas futuras

Este trabalho teve por objectivo estudar culturas de células em suspensão de *Arabidopsis thaliana* como plataforma de expressão de proteínas recombinantes. A glicoproteína humana eritropoietina (EPO), que apresenta um padrão de glicosilação complexo, foi usada como proteína modelo de estudo.

Arabidopsis thaliana é uma planta modelo muito simples cujo genoma já está completamente sequenciado ('The Arabidopsis Genome Initiative', 2000). Esta planta é considerada um bom modelo de estudo para *Molecular Farming* porque é fácil de transformar e manipular em laboratório, mas até ao momento não existe nenhuma descrição na literatura sobre o uso de culturas de células de *Arabidopsis* para produção de proteínas recombinantes. O trabalho desenvolvido nesta dissertação apresenta como novidade o estabelecimento de linhas celulares de *Arabidopsis* para avaliar a pontencialidade deste sistema vegetal na produção de proteínas heterólogas.

As plantas possuem características vantajosas para a síntese de glicoproteínas recombinantes para aplicação farmacêutica. No entanto, um argumento comum contra o uso de plantas como um sistema de produção para proteínas terapêuticas é a incapacidade que têm de realizar a N-glicosilação de forma semelhante à N-glicosilação em mamíferos. As glicoproteínas produzidas em plantas são desprovidas de $\beta(1,4)$ -galactose, de ácido siálico e possuem dois resíduos que não existem em proteínas produzidas em mamíferos, $\beta(1,2)$ -xilose e $\alpha(1,3)$ -fucose. Estas diferenças podem constituir um problema para a utilização das plantas como sistema de expressão biofarmacêutico. De facto, a N-glicosilação de proteínas terapêuticas é essencial para a solubilidade, estabilidade, bioactividade, *folding* correcto das proteínas (Yin *et al.*, 2009). Além disso, os resíduos de ácido siálico são importantes para a actividade biológica e semi-vida de glicoproteínas recombinantes terapêuticas em humanos (Castillo *et al.*, 2008). Para produzir glicoproteínas recombinantes terapêuticas em plantas é necessário modificar a via de N-glicosilação para evitar a imunogenicidade de resíduos não mamíferos e para permitir a adição de ácido siálico terminal. Vários estudos já têm sido realizados no sentido de criar plantas modificadas que realizem a glicosilação de forma semelhante à dos mamíferos. Strasser *et al.* (2008) modificaram *Nicotiana benthamiana* para a produção de anticorpos monoclonais com estruturas de N-glicanos semelhantes às de mamíferos. Também para *Arabidopsis* poderão ser realizados *knockouts* de forma a produzir glicoproteínas recombinantes com estruturas de N-glicanos complexos sem os resíduos imunogénicos $\beta(1,2)$ -xilose e $\alpha(1,3)$ -fucose. Castillo *et al.*

(2008) investigaram a construção de uma via biossintética de ácido siálico em *Arabidopsis*. Os resultados por eles obtidos irão contribuir significativamente para a produção em plantas de glicoproteínas contendo ácido siálico.

Até à data nenhum estudo foi publicado com as quatro modificações na via de glicosilação em *Arabidopsis*. Será fundamental modificar *Arabidopsis thaliana* para criar mecanismos de glicosilação que adicionem ácido siálico e galactose às glicoproteínas e que não adicionem os resíduos específicos de plantas $\beta(1,2)$ -xilose e $\alpha(1,3)$ -fucose. Mas sendo a *Arabidopsis* uma planta modelo simples, plantas transgênicas com todas as alterações necessárias nos mecanismos de glicosilação estarão disponíveis futuramente. Assim, será usada a *Arabidopsis* transgênica com todas as modificações de glicosilação para expressão da proteína recombinante.

Se por um lado, para “humanizar” as glicoproteínas produzidas em *Arabidopsis thaliana* poderão ser usados mutantes desta espécie com as modificações na via de glicosilação, por outro lado poderá investigar-se a relação de produção de N-glicanos com as várias fases da curva de crescimento. Yin *et al.* (2009) realizaram um estudo com a linha celular BY2 de tabaco e concluíram que os N-glicanos oligomanose foram predominantes na fase inicial do crescimento celular, enquanto que a quantidade de N-glicanos do tipo complexo contendo $\beta(1,2)$ -xilose e $\alpha(1,3)$ -fucose específicos de plantas aumentou significativamente após a linha celular BY2 entrar na fase final de crescimento. Se o mesmo se verificar para *Arabidopsis thaliana* sem modificações nos mecanismos de glicosilação, a proteína deverá ser recuperada na fase inicial de crescimento para não ter os resíduos imunogênicos.

As culturas de células em suspensão são mantidas sob condições padronizadas e estéreis, sendo possível controlar a produção completa da proteína recombinante desde o início do estabelecimento da cultura celular até ao passo de purificação final de acordo com boas práticas de fabrico. Esta é uma vantagem significativa para obter aprovação regulamentar de produtos farmacêuticos produzidos em plantas. Optimizando parâmetros como o nível de expressão da proteína, o crescimento celular da cultura e os processos de purificação, as culturas de células vegetais serão mais vantajosas e promissoras que as plantas, que não garantem um controlo rigoroso na produção do produto, surgindo problemas como variação da proteína ao longo de várias gerações, inactivação do gene e contaminação nos campos de cultivo.

No presente trabalho foram estabelecidas culturas de células em suspensão de *Arabidopsis* expressando EPO na forma secretada para o apoplasto e expressando EPO na forma retida no

retículo endoplasmático. Estas culturas foram analisadas em termos de estabilidade das linhas celulares, da viabilidade das células, rendimento e recuperação do produto. Os resultados obtidos foram comparados com os de *Medicago truncatula* que é outra espécie sob estudo no nosso laboratório.

A presença de EPO na forma secretada no meio de cultura foi confirmada, assim como a presença de EPO na forma retida nos extractos celulares. A quantidade de proteína recuperada do meio de cultura foi reduzida, mas prevê-se que o rendimento aumente à medida que as culturas se tornem mais homogêneas e adaptadas às condições de crescimento. A EPO na forma retida produzida em *Arabidopsis* apresentou uma massa molecular superior comparativamente à EPO na forma secretada produzida em *Medicago*, sugerindo que a EPO está a ser direccionada a vias não esperadas. A proteína secretada poderá estar a ser direccionada ao vacúolo, tornando-se numa proteína com uma massa molecular mais baixa, em que os N-glicanos são do tipo paucimanosídicos. Outra hipótese para esta diferença poderá dever-se a factores específicos de espécie que podem diferir nos seus mecanismos de glicosilação de proteínas. A EPO apresenta três potenciais sítios de N-glicosilação, mas estes podem não ser preenchidos ou serem, mas de forma diferente nas duas espécies. Ao contrário de EPO na forma secretada que apresentou duas isoformas, foi apenas detectada uma isoforma de EPO na forma secretada no extracto celular. Isto revela maior homogeneidade na produção de EPO, característica que poderá favorecer a EPO na forma retida, pois a homogeneidade é um dos requisitos das entidades regulamentares para aprovação de proteínas recombinantes com aplicações terapêuticas. Além disso, o retículo endoplasmático confere mais estabilidade à EPO livre das proteases do meio de cultura, favorecendo a acumulação de proteína sem a adição dos resíduos imunogénicos de $\alpha(1,3)$ -fucose e $\beta(1,2)$ -xilose.

A purificação parcial da EPO presente no meio de cultura da linha de *Medicago* foi atingida, usando cromatografia de troca catiónica como passo de purificação inicial. A cromatografia de afinidade com iões metálicos imobilizados foi usada após a cromatografia de troca catiónica, mas mostrou-se ineficiente. A proteína não ligou à resina e perdeu-se a totalidade no *flow-through*. As razões possíveis poderão ser a perda do *tag* de histidina ou a conformação que a proteína adquire não expõe o *tag* que fica inacessível aos iões imobilizados na resina impedindo a ligação.

A cromatografia de troca catiónica também foi usada como passo de purificação inicial de EPO presente no meio de cultura de uma linha celular de *Arabidopsis*.

A linha celular de *Arabidopsis* apresentou um crescimento muito reduzido ao longo de 35 dias, atingindo a fase estacionária ao fim de aproximadamente 27 dias. O baixo crescimento pode ser

um dos factores que está a contribuir para a quantidade reduzida de EPO verificada no meio de cultura. No entanto a acumulação de EPO pode ser melhorada, optimizando as condições de crescimento das culturas.

Da análise morfológica das células verificou-se que as células de *Medicago* apresentam dimensões muito grandes. O aumento do volume do vacúolo conduziu ao alongamento das células, ocupando quase a totalidade do volume da célula, enquanto que a quantidade de citoplasma foi reduzida. Nas culturas de *Arabidopsis* verificou-se frequentemente a formação de aglomerados e poucas vezes células livres. As células apresentam dimensões menores que as células de *Medicago* e o vacúolo ocupa menos volume total da célula, mas verificou-se que ao aumentar a concentração de reguladores de crescimento (cinetina e 2,4-D) no meio de cultura das linhas celulares de *Arabidopsis* as células aparentemente alongaram e tornaram-se maiores. No geral as células de *Medicago* apresentaram-se viáveis. As células em grandes aglomerados foram as que apresentaram mais dificuldade em manterem-se viáveis.

No meio de cultura de linhas celulares de *Arabidopsis*, foram observados muitos aglomerados compactos, sendo na periferia que se observaram algumas células viáveis. Os agregados apresentaram a tendência a dividirem-se e a afastarem-se, enquanto que células isoladas raramente foram visualizadas.

O trabalho desenvolvido nesta dissertação ainda é bastante preliminar devido à duração do projecto. Trabalho futuro irá envolver a optimização do crescimento das culturas de células de *Arabidopsis* de forma a maximizar a acumulação de EPO, alterando as condições de crescimento de cada linha celular como por exemplo a formulação do meio de cultura para tentar encontrar quais são as condições mais favoráveis ao crescimento das culturas.

Será necessário investigar outras abordagens mais eficientes para a purificação da EPO. Poderá ser possível optimizar a purificação por cromatografia de troca iónica e/ou pelo *tag* de histidina, alterando alguns parâmetros, como tempo de ligação, condições do tampão e volume de resina. Também poderá ser usada diálise antes de usar cromatografia, de forma a eliminar iões presentes no meio de cultura e facilitar a ligação da proteína. Embora a cauda de histidinas possa estar inacessível para se ligar à resina de níquel, uma possibilidade poderia ser a desnaturação da proteína antes de ser passada na coluna. O problema deste passo seria a EPO perder a sua estrutura nativa e deixar de ser biologicamente activa.

Quando se atingir a purificação da proteína, as várias formas de proteína produzida e os seus padrões de glicosilação irão ser determinados por Espectrometria de Massa, de forma a avaliar a heterogeneidade do sistema celular proposto. Será necessário identificar os N-glicanos

constituintes da proteína, de modo a tentar identificar se existem glicoformas representadas em maior quantidade que possibilitem uma concentração significativa de proteína recombinante com glicosilação homogênea.

Será importante realizar estudos bioquímicos de caracterização estrutural, incluindo modificações pós-traducionais. A análise dos N-glicanos em conjunto com o estudo da distribuição celular da proteína por microscopia electrónica poderá ajudar a compreender os mecanismos pós-traducionais nesta planta. É possível que a versão retida no retículo endoplasmático não acumule apenas neste compartimento, mas também em outros compartimentos subcelulares. A proteína poderá estar a ser sobre-expressa no retículo que não possui capacidade para acumular grandes quantidades de proteína. Além disso é possível que a EPO na forma secretada acumule no retículo endoplasmático e não apenas no meio de cultura.

Numa fase mais final será necessário testar a actividade da EPO recombinante *in vitro* e *in vivo*. Devido à ausência dos resíduos de ácido siálico na EPO produzida em plantas, esta proteína não será tão interessante para aplicações de hematopoiese. Mas a ausência de ácido constitui uma vantagem para o uso de EPO, que para além do efeito em hematopoiese também possui propriedades de protecção dos tecidos e neste caso é indesejável a presença de ácido siálico que poderia provocar excessiva hematopoiese. A EPO sialada que é produzida em células de mamíferos requer a remoção de ácido siálico para permitir exercer a actividade de protecção de tecidos sem efeitos colaterais. Nas plantas não é necessário desialilar a proteína, o que constitui uma vantagem face à produção em células de mamífero.

Também é necessário realizar estudos de imunogenicidade, já que a EPO secretada para o apoplasto deverá possuir os resíduos imunogénicos $\alpha(1,2)$ -fucose e $\beta(1,3)$ -xilose, no entanto como foi descrito anteriormente, quando existirem plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* com os mecanismos de glicosilação “humanizados”, os resíduos imunogénicos específicos de plantas deixarão de representar um problema.

As culturas de células em suspensão de *Arabidopsis thaliana* estabelecidas mostram-se promissoras como um sistema viável para a produção de proteínas recombinantes. Os resultados obtidos neste estudo serão muito úteis para pesquisas futuras, que irão contribuir para o estabelecimento de novas plataformas vegetais para a produção de moléculas economicamente importantes.

5. Referências bibliográficas

Abranches, R., Marcel, S., Arcalis, E., Altmann, F., Fevereiro, P. e Stoger, E. (2005a) Plants as bioreactors: a comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. *Journal of Biotechnology*. 120, 121-134.

Abranches, R.; Shultz, R.W.; Thompson, W.F. and Allen, G.C. (2005b). Matrix Attachment Regions and regulated transcription increase and stabilize transgene expression. *Plant Biotechnology Journal*. 3, 535-543.

Abranches, R., Arcalis, E., Marcel, S., Altmann, F., Ribeiro-Pedro, M., Rodriguez, J. e Stoger, E. (2008) Functional specialization of *Medicago truncatula* leaves and seeds does not affect the subcellular localization of a recombinant protein. *Planta*. 227, 649-658.

An, G. (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiology*. 79, 568-570.

Arcalis, E., Marcel, S., Altmann, F., Kolarich, D., Drakakaki, G., Fischer, R., Christou, P. e Stoger, E. (2004) Unexpected deposition patterns of recombinant proteins in post-endoplasmic reticulum compartments of wheat endosperm. *Plant Physiology*. 136, 3457-3466.

Bakker, H., Bardor, M., Molthoff, J.W., Gomord, V., Elbers, I., Stevens, L.H., Jordi, W., Lommen, A., Faye, L., Lerouge, P. e Bosch, D. (2001) Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98, 2899-2904.

Barta, A., Sommergruber, K., Thompson, D., Hartmuth, K., Matzke, M.A. e Matzke, A.J.M. (1986) The expression of a nopaline synthase - human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*. 6, 347-357.

Basaran, P. e Rodriguez-Cerezo, E. (2008a) An assessment of emerging molecular farming activities based on patent analysis (2002-2006). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 13, 304-312.

Basaran, P., e Rodríguez-Cerezo, E. (2008b) Plant molecular farming: opportunities and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*. 28, 153-172.

Bernatchez, S., Gilbert, M., Blanchard, M.-C., Karwaski, M.-F., Li, J., DeFrees, S. e Wakarchuk, W. W. (2007) Variants of the β 1,3-galactosyltransferase CgtB from the bacterium *Campylobacter*. *Glycobiology*. 17, 1333-1343.

Boehm R. (2007) Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1102, 121-34.

Castillo, A., Pabst, M., Leonard, R., Veit, C., Altmann, F., Mach, L., Glössl, J., Strasser, R. e Steinkellner, H. (2008) Construction of a functional CMP-sialic acid biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 147, 331-339.

Çelik, E., Çalik, P. e Oliver, S.G. (2007) Production of recombinant human erythropoietin from *Pichia pastoris* and its structural analysis. *Journal of Applied Microbiology*. 103, 2084-2094.

Cheon, B.Y., Kim, H.J., Oh, K.H., Bahn, S.C., Ahn, J.H., Choi, J.W., Ok, S.H., Bae, J.M. e Shin, J.S. (2004) Overexpression of human erythropoietin (EPO) affects plant morphologies: retarded vegetative growth in tobacco and male sterility in tobacco and *Arabidopsis*. *Transgenic Research*. 13, 541-549.

Christou, P., McCabe, D. E., Swain, W. F. (1988) Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. *Plant Physiology*. 87, 671-674.

Clough, S.J. e Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* – mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. The plant transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 16, 735-143.

Commandeur, U., Twyman, R.M. e Fischer, R. (2003) The biosafety of molecular farming in plants. *AgBiotechNet*. 5, ABN 110.

Conley, J.A., Mohib, K., Jevnikar, M.A. e Brandle, E.J. (2009) Plant recombinant erythropoietin attenuates inflammatory kidney cell injury. *Plant Biotechnology Journal*. 7, 183-199.

Cox, K.M., Sterling, J.D., Regan, J., T., Gasdaska, J.R., Frantz, K.K., Peele, C.G., Black, A., Passmore, D., Moldovan-Loomis, C., Srinivasan, M., Cuisson, S., Cardarelli, P.M. e Dickey, L.F. (2006) Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nature Biotechnology*. 24, 1591-597.

Daniell, H., Streatfield S.J. e Wycoff K. (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines on plants. *Trends in Plant Science*. 6, 219-226.

Doran, P.M. (2006) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends in Biotechnology*. 24, 426-432.

Erbayraktar, S., Brasso, G., Sfacteria, A., Xie, Q., Coleman, T., Kreilgaard, M., Torup, L., Sager, T., Erbayraktar, Z., Gokmen, N., Yilmaz, O., Ghezzi, P., Villa, P., Fratelli, M., Casagrande, S., Leist, M., Helboe, L., Gerwein, J., Christensen, S., Geist, M.A., Pedersen, L.Ø., Ceramid-Hand, C., Wuerth, J.-P., Ceramy, A., e Brines, M. (2003) Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity *in vivo*. *Medical Sciences*. 100, 6741-6746.

Faye, L., Boulaflousa, A., Benchabanea, M., Gomorda, V. e Dominique Michaud, D. (2005) Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine*. 23, 1770-1778.

Fischer R. e Emans N. (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Researc*. 9, 279-299.

Gomord V. e Faye L. (2004) Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 7, 171-181.

González-Melendi, P., Pires, A.S. e Abranches, R. (2009) Cell-line-dependent sorting of recombinant phytase in cell cultures of *Medicago truncatula*. *Functional Plant Biology*. 36, 431-441.

Hamilton, S.R., Davidson, R.C., Sethuraman, N., Nett, J.H., Jiang, Y., Rios, S., Bobrowicz, P., Stadheim, T.A., Li, H., Choi, B.K., Hopkins, D., Wischnewski, H., Roser, J., Mitchell, T., Strawbridge, R.R., Hoopes, J., Wildt, S. e Gerngross, T.U. (2006) Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*, 313, 1441-1443.

Hellwig S., Drossard J., Twyman R.M. e Fischer R. (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology*. 22, 1415-1422.

Hiatt, A., Caffferkey, R. e Bowdish, K. (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*. 342, 76-78.

Hood, E. E., Witcher, D. R., Maddock, S., Meyer, T., Baszczyński, C., Bailey, M., Flynn, P., Register, J., Marshall, L. Bond, D., Kulisek, E., Kusnadi, A., Evangelista, R., Nikolov, Z., Wooge, C., Mehig, R. J., Hernan, R., Kappel, W. K., Ritland, D., Li, C. P. e Howard, J. A. (1997) Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Molecular Breeding*. 3, 291-306.

Horn, M.E., Woodard, S.L. e Howard, J.A. (2004) Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Reports*. 22, 711-720.

Imai, N., Higuchi, M., Kawamura, A., Tomonoh, K., Oh-Eda, M., Fujiwara, M., Shimonaka, Y. e Ochi, N. (1990) Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin *in vitro*. *European Journal of Biochemistry*. 194, 457-462.

Kaiser J. (2008) Is the drought over for pharming? *Science*. 320, 473-475.

Kieran, P.M., Mac-Loughlin, P.F. e Malone, D.M. (1997) Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*. 59, 39-52.

Leist, M., Ghezzi, P., Grasso, G., Bianchi, R., Villa, P., Fratelli, M., Savino, C., Bianchi, M., Nielsen J., Gerwien. J., Kallunki, P., Larsen, A., K., helboe, L., Christensen, S., Pedersen, L., O., Nielsen, M., Torup, L., Sager, T., Sfacteria, A., Erbayraktar, S., Erbayraktar, Z., Gokmen, N.,

Yilmaz, O., Cerami-Hand, C., Xie, Q-w, Coleman, T., Cerami, A. (2004) Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*. 305, 239-242.

Li, J., Hegeman, C.E., Hanlon, R.W., Lacy, C.H., Denbow, D.M. e Grabau, E.A. (1997) Secretion of Active Recombinant Phytase from Soybean Cell-Suspension Cultures. *Plant Physiology*. 114, 1103-1111.

Liénard D., Sourrouille C., Gomord V. e Faye L. (2007) Pharming and transgenic plants. *Biotechnology Annual Review*. 13, 115-147.

Matsumoto, S., Ikura, K., Ueda, M. e Sasaki, R. (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Molecular Biology*. 27, 1163-1172.

McCann, M. C., Stacey N. J., Wilson, R. e Roberts, K. (1993) Orientation of macromolecules in the walls of elongating carrot cells. *Journal of Cell Science*. 106, 1347-1356.

McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry J., Barnason, A., Horsch, R. e Fraley, R. (1986) Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*. 5, 81-84.

Mulabagal, V. e Tsay, H.-S. (2004) Plant cell cultures – an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*. 2, 29-48.

Musa, T.A., Hung, C.-Y., Darlington, D.E., Sane, D.C., e Xie, J. (2009) Overexpression of human erythropoietin in tobacco does not affect plant fertility or morphology. *Plant Biotechnology*. 3, 157-165.

Paccalet, T., Bardor, M., Rihouey, C., Delmas, F., Chevalier, C., D'Aoust, M.-A., Faye, L., Vézina, L., Gomord, V. e Lerouge, P. (2007) Engineering of a sialic acid synthesis pathway in transgenic plants by expression of bacterial Neu5AC-synthesizing enzymes. *Plant Biotechnology Journal*. 5, 16-25.

Pires A.S., Cabral M.G., Fevereiro P., Stoger E., Abranches R. (2008) High levels of stable phytase accumulate in the culture medium of transgenic *Medicago truncatula* cell suspension cultures. *Journal of Biotechnology*. 3, 916-923.

Schillberg, S., Fischer, R. e Emans, N. (2003) Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60, 433-445.

Slater, A., Scott, N. e Fowler, M. (2003) Plant tissue culture. In: Slater, A., Scott, N. e Fowler, M. (Ed.), *Plant Biotechnology: The Genetic Manipulation of Plants*. Oxford University Press, Oxford, pp. 35-56.

Sommer, S., Köhle, A., Yazaki, K., Shimomura, K., Bechthold, Andreas e Heide, L. (1999) Genetic engineering of shikonin biosynthesis hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon* transformed with the bacterial *ubiC* gene. *Plant Molecular Biology*. 39, 683-693.

Sourrouille, C., Marquet-Blouin, E., D'Aoust, M.-A., Kiefer-Meyer, M.-C., Seveno, M., Pagny-Salehabadi, S., Bardor, M., Durambur, G., Lerouge, P., Vezina, L. e Gomord, V. (2008) Down-regulated expression of plant-specific glycoepitopes in alfalfa. *Plant Biotechnology Journal*. 6, 702-721.

Stoger, E., Sack, M., Fischer, R. e Christou, P. (2002) Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. *Current Opinion in Biotechnology*. 13, 161-166.

Strasser, R., Altmann, F., Mach, L., Glössl, J. e Steinkellner, H. (2004) Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking β 1,2-linked xylose and core α 1,3-linked fucose. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology*. 561, 132-136.

Strasser, R., Bondili, J.S., Vavra, U., Schoberer, J., Svoboda, B., Glössl, J., Léonard, R., Stadlmann, J., Altmann, F., Steinkellner, H. e Mach, L. (2007) A unique β 1,3-galactosyltransferase is indispensable for the biosynthesis of N-glycans containing Lewis a structures in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. 19, 2278-2292.

Strasser, R., Stadlmann, J., Schähs, M., Stiegler, G., Quendler, H., Mach, L., Glössl, J., Weterings, K., Pabst, M. and Steinkellner, H. (2008) Generation of glyco-engineered *Nicotiana*

benthamiana for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure. *Plant Biotechnology Journal*. 6, 392-402.

'The Arabidopsis Genome Initiative' (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408, 796-815.

Thorpe, T.A. (2007) History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*. 37, 169-180.

Toledo, J.R., Sanchez, O., Segui, R.M., Garcia, G., Montanez, M., Zamora, P.A., Rodriguez, M.P. e Cremata, J.A. (2006) High expression level of recombinant human erythropoietin in the milk of non-transgenic goats. *Journal of Biotechnology*. 123, 225-235.

Twyman, R.M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. e Fischer, R. (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*. 21, 570-578.

Vasil, I.K. (2008) A short history of plant biotechnology. *Phytochemistry Reviews*. 7, 387-394.

Weise, A., Altmann, F., Rodriguez-Franco, M., Sjöberg, E.R., Bäumer, W., Launhardt, H., Kietzmann, M. e Gorr, G. (2007) High-level expression of secreted complex glycosylated recombinant human erythropoietin in the *Physcomitrella* Δ -fuc-t Δ -xyl-t mutant. *Plant Biotechnology Journal*. 5, 389-401.

Yin, B, Zheng, N., Li, Y., Tang, S., Liang, L. e Xie, Q. (2009) Growth phase-dependent expression of proteins with decreased plant-specific N-glycans and immunogenicity in tobacco BY2 cells. *Science in China Series C: Life Sciences*. 52, 739-746.

Anexos

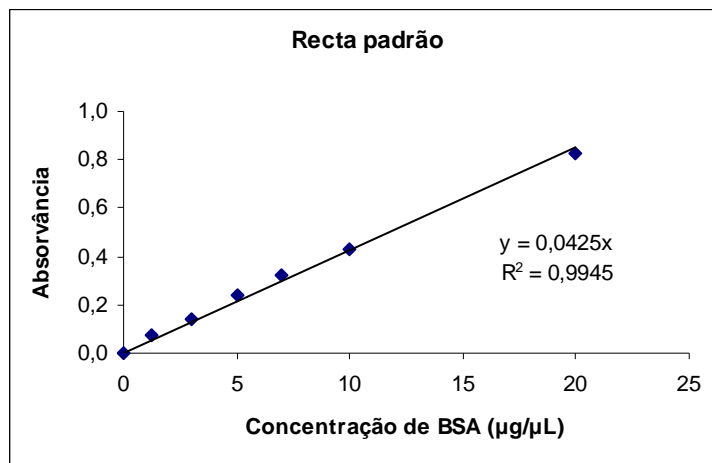


Figura 26: Curva de calibração padrão da concentração de proteína BSA como referido na secção 2.7

Tabela 3: Coloração com prata de géis de acrilamida

| Passos | Soluções | Tempo de incubação |
|--------------------|---|--|
| 1. Fixação | 50% Etanol; 12% Ácido acético; 0,5 mL.L ⁻¹ formaldeído 37% | Pelo menos 1 hora |
| 2. Lavagem | 50 % de Etanol | 3 X 20 minutos |
| 3. Pré-tratamento | 0,2 g.L ⁻¹ de tiosulfato de sódio pentahidratado | 1 minuto |
| 4. Lavagem | H ₂ O ultrapura | 3 X 20 segundos |
| 5. Impregnação | 2 g.L ⁻¹ de nitrato de prata; 0,75 mL.L ⁻¹ de formaldeído 37% | 20 minutos |
| 6. Lavagem | H ₂ O ultrapura | 2 X 20 segundos |
| 7. Desenvolvimento | 60 g.L ⁻¹ de carbonato de sódio 4 mg.L ⁻¹ de tiosulfato de sódio pentahidratado 0,5 mL.L ⁻¹ de formaldeído 37% | tempo controlado pela visualização das bandas) |
| 8. Paragem | 50% Etanol; 12% Ácido acético | 10 minutos |

| Nº da solução | Volume final (ml) | Quantidades (soluções em água bidestilada) |
|---------------|-------------------|--|
| 1 | 100 | 50 ml EtOH; 12 ml ác. Acético; 50 µl de formaldeído 37% |
| 2 | 200 | 100 ml de EtOH |
| 3 | 150 | 0,03 g de tiosulfato de sódio pentahidratado |
| 5 | 50 | 0,1 g de nitrato de prata 37,5 µl de formaldeído 37% |
| 7 | 75 | 9 g de carbonato de sódio 0,0006 g de tiosulfato de sódio pentahidratado 37,5 µl de formaldeído 37 % |
| 8 | 100 | 50 ml de EtOH; 12 ml de ác. acético |

Preparação de soluções:

Tampão para o gel de poliacrilamida de concentração

0.5M Tris-HCl (pH 6.8); 6,0g de Tris são dissolvidas em 40 ml de água, o pH é acertado com HCl 1M (± 48 ml) para 6,8 e perfaz-se para 100 ml com água. A solução é guardada a 4°C.

Tampão para o gel de poliacrilamida de resolução

3M Tris-HCl (pH 8.8); 36,3 g de Tris são dissolvidas em 48 ml de HCl 1M e perfaz-se para um volume final de 100 ml com água.

A solução é guardada a 4°C

SDS a 10%

10 g em 100 ml de água. A solução deve ser incolor e translúcida. Aquecer para dissolver. Guardada a temperatura ambiente (precipita no frio).

Persulfato de amônio a 1,5%

0,15 g de persulfato de amônio em 10 ml de água. A solução é instável e por isso deve ser feita imediatamente antes de usar.

TEMED

Usada na forma em que é fornecida. É estável a 4°C num frasco escuro.

Tampão extracção de proteínas

1m mM ácido ascórbico (Sigma); 500 mM NaCl (MERCK); 5 mM B-Mercaptoetanol (Sigma); pH ~8,8

Tampão de amostra de proteínas concentrado 4 vezes

0,125 M Tris base

0,4% (w/v) SDS (riedel-De Haën)

20% (v/v) Azul de bromofenol (BDH)

20% (v/v) B-Mercaptoetanol (Sigma)

Tris-Base pH 6,8 0,125 M

SDS 0,4%

Glicerol 20%

Bromophenol Blue 0,05%

B-mercaptoetanol 20%

Corante Azul de Coomassie G250

45% (v/v) metanol 100% (Pronalab)

10% (v/v) ácido acético (Pronalab)

0,1% (w/v) azul de Coomassie (BioRad)

Descorante do Azul de Coomassie G250

45% (v/v) metanol 100%

10% (v/v) ácido acético

Tampão de corrida

25 mM Tris base

192 mM Glicina

0,1% SDS

Tampão de transferência

10% (v/v) Tampão de corrida concentrado 10 vezes

20% (v/v) Metanol 100%

Tampão PBS

8,006% (w/v) NaCl

0,201% (w/v) KCl (MERCK)

2,901% (w/v) Na₂HPO₄·12H₂O

0,204% (w/v) KH₂PO₄

pH ~ 7,4

Tampão PBST

1 L PBS

0,1% (v/v) Tween 20 (Sigma)

Tampão NBT/BCIP

0,1 M Tris.HCl pH 9.0

0,01 M NaCl

0,05 M MgCl₂

Cromatografia de troca iônica:

Tampão de equilíbrio acetato de sódio, 50 mM pH 5

Solução 50 mM de C₂H₃NaO₂

Acertar pH com ácido acético concentrado

Tampão concentrado de acetato de sódio, 0,2 M pH 5,0

Adicionou-se tampão acetato de sódio, 0,2 M pH 5,0 (1/3 do volume de amostra)

Tampões de eluição

NaCl 1M em tampão de equilíbrio 50 mM pH 5

NaCl 0,5 M em tampão de equilíbrio 50 mM pH 5

Preparação de solução-stock de hormonas:

10 mg de cinetina em 10 ml de H₂O destilada (1mg/ml)

10 mg de 2,4 D em 10 mg de H₂O destilada (1mg /ml)

As hormonas são insolúveis em água, por isso são dissolvidas em ácido, base ou álcool

Preparação de solução-stock de DTT :

250 mg de DTT em 0,5 mL de H₂O destilada (10 mg/ml)

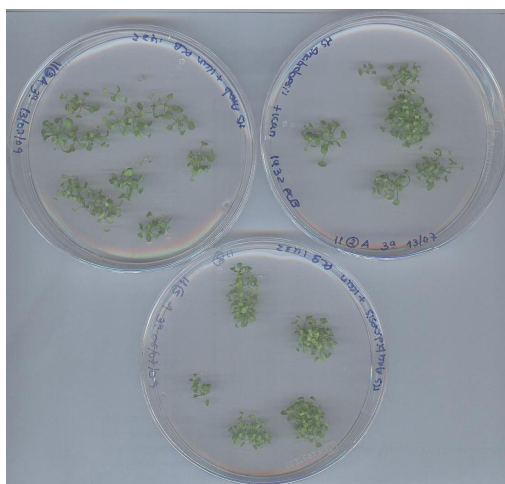


Figura 27: Germinação de sementes de terceira geração

Tabela 4: Crescimento da biomassa (peso fresco e peso seco (g) por ml de meio de cultura)

| Dia | g FW/mL | g DW/mL |
|-----|---------|---------|
| 0 | 0,03355 | 0,00136 |
| 3 | 0,01829 | 0,00078 |
| 6 | 0,01582 | 0,00071 |
| 10 | 0,01760 | 0,00071 |
| 13 | 0,01953 | 0,00093 |
| 17 | 0,01740 | 0,00077 |
| 22 | 0,01911 | 0,00083 |
| 35 | 0,01880 | 0,00082 |

O seguinte abstract irá ser apresentado sob a forma de poster no Congresso Nacional MicroBiotec09, em Vilamoura, Algarve, de 28 a 30 de Novembro de 2009:

Erythropoietin production in *Arabidopsis thaliana* cell cultures

Sónia M. Dias, Ana Sofia Pires and Rita Abranches

Plant Cell Biology Laboratory, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, ITQB-UNL. 2781-901 Oeiras, Portugal

The large-scale production of recombinant proteins in plant systems, known as Molecular Farming, offers many practical and safety advantages when compared to traditional platforms. Plant cell suspension cultures are an attractive alternative system, as they combine the advantages of both whole plant and cell culture production systems. In this work cell suspension cultures from *Arabidopsis thaliana* are used as a platform to study the expression of the recombinant protein Erythropoietin (rEPO), a human glycosylated hormone which regulates the formation of erythrocytes in mammals.

The main objectives consist on assessing the potential of *Arabidopsis* cell suspension cultures for recombinant protein production and performing an integrative analysis of the results obtained, taking into account cell culture performance in terms of cell line stability, cell viability, yield and product recovery. By comparing these results with the ones obtained from *Medicago truncatula*, another plant model under study in our laboratory, we will gain further insight on species-specific factors that have an impact on final product quality.

Cell cultures were generated from transgenic *Arabidopsis* plants which express rEPO, either secreted or ER-retained. For both forms we confirmed that the recombinant protein was present either in the culture medium or in the cellular extracts. Several strategies were addressed to purify EPO from cell cultures of *Arabidopsis* and *Medicago*, including ion-change and affinity chromatography, and we have achieved partial purification of EPO. We have also observed the morphology of the cells and analysed the viability of the cultures using light and fluorescence microscopy. We compared cultures of both plant species and performed several staining procedures using neutral red and acridine orange fluorescent dyes. *Arabidopsis* cultures showed smaller cells than those of *Medicago* and more compact clusters. In *Medicago* cells the vacuolar compartment took up most of the cellular volume and the cytoplasmatic volume was reduced.

Future work involves the optimization of *Arabidopsis* cell cultures to maximize accumulation of EPO and designing a better approach for EPO purification. These results will contribute to the establishment of new plant-based platforms for production of high valuable molecules.

Keywords: Erythropoietin, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, recombinant protein, suspension cell cultures, molecular farming.